

Aus der Abteilung Pharmakologie
des Veterinärpharmakologischen Institutes
der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. H. Kewitz

Beeinflussung der Synthese von Tryptophanpyrrolase in der Rattenleber

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin
an der
Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Herbert Wagner
Tierarzt aus Chemnitz
Berlin 1964

Journal-Nr. 472

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e. V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus der Abteilung Pharmakologie
des Veterinärpharmakologischen Institutes
der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. H. Kewitz

Beeinflussung der Synthese von Tryptophanpyrrolase in der Rattenleber

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin
an der
Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Herbert Wagner
Tierarzt aus Chemnitz
Berlin 1964

Journal-Nr. 472

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen
Fakultät der Freien Universität Berlin



Dekan : Professor Dr. H.J. Heidrich

Referent: Professor Dr. H. Kewitz

Korreferent: Professor Dr. Dr. K. Drepper

Tag der Promotion : 17. Juli 1964

Inhaltsverzeichnis:

Seite

Einleitung	4
Methodik	8
a) Tiermaterial	8
b) Durchführung der Operationen	8
c) Verabreichte Substanzen	9
d) Herstellung des Homogenates zur Bestimmung der Tryptophanpyrrolaseaktivität	10
e) Bestimmung der Tryptophanpyrrolaseaktivität	10
f) Bestimmung der Evipanabbaugeschwindigkeit	11
g) Herstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen	12
Ergebnisse	
a) Aktivierung der Tryptophanpyrrolase durch Hämatin im Leberhomogenat	13
b) Abhängigkeit der Tryptophanpyrrolaseaktivität von der Rasse, dem Geschlecht und dem Körpergewicht bzw. vom Lebensalter der Ratten.	17
c) Induktive Mehrbildung der Tryptophanpyrrolase	20
d) Bedeutung der Nebennieren für die Induktion durch Tryptophan und Cortison	25
e) Einfluß der Gonaden auf die Induktion der Tryptophanpyrrolase	28
f) Die Folgen der Thyreo-Parathyreoidektomie für die Induktion der Tryptophanpyrrolase	34
g) Nahrungsentzug und Tryptophanpyrrolaseaktivität	35
h) Elektronenmikroskopisch sichtbare Veränderungen in der Leberzelle nach der Induktion mit Corti- son und Tryptophan	37
Besprechung der Ergebnisse	47
a) Untersuchungen in vitro	47
b) Untersuchungen in vivo	49
Zusammenfassung	58
Literaturverzeichnis	60

Einleitung:

Nachdem durch biochemische Forschungen insbesondere an Mikroorganismen die wesentlichen Schritte zur Biosynthese von Proteinen aufgeklärt waren, ließen sich die Wirkungen einiger Arzneimittel auf Eingriffe in diejenigen Reaktionen zurückführen, die für die Eiweißbildung bedeutsam sind. Zum Beispiel beruht die Wirkung mancher Chemotherapeutika, zahlreicher Tumorstoffe und wahrscheinlich auch der anabolen Steroidderivate auf von ihnen hervorgerufenen Veränderungen des Proteinstoffwechsels. Dagegen sind elektive Beeinflussungen des intrazellulären Umsatzes ganz bestimmter Eiweißkörper bisher nur bei der Gewöhnung als Grundlage pharmakologischer Wirkungen erkannt worden. Derartige Effekte können durch Einwirkungen auf die Mechanismen zustande kommen, die die Bildungs- und Abbaugeschwindigkeit einzelner Proteine regulieren. Im erwähnten Beispiel führt die wiederholte Behandlung mit Luminal im Laufe mehrerer Tage zu einem Anstieg der TPN-abhängigen oxydierenden Enzyme in den Lebermikrosomen, die für den Abbau verschiedener Medikamente verantwortlich sind(1). Dadurch wird deren Wirkung abgeschwächt, und für den gleichen Effekt ist eine höhere Dosis erforderlich. Einzelheiten über das Zustandekommen einer solchen Anregung der Synthese bestimmter Enzyme sind nicht bekannt.

Nähere Einblicke in die Regulationsvorgänge der Enzymsynthese haben sich bisher nur aus Experimenten an Bakterien ergeben. Die Franzosen Jacob und Monod vom Pasteur-Institut in Paris haben aus ihren Versuchsergebnissen eine Hypothese entwickelt (2), die sich zum Teil auch auf die Warmblüterzelle übertragen läßt und zumindest als Grundlage für weitere Forschungen dienen kann. Danach wird die Geschwindigkeit der Proteinsynthese durch zwei genetisch festgelegte Faktoren bestimmt, die die Aktivität der Strukturgene vollständig oder partiell hemmen. Es handelt sich um ein System, das aus einem als Repressor bezeichneten Stoff besteht, dessen Synthese durch ein sogenanntes Regulatorgen gesteuert wird. Der Repressor bremst die Bildung mehrerer funktionell zusammenhängender Enzyme, deren Strukturgene auf den Chromosomen be-

nachbart sind. Bei Mutanten, denen das Regulatorgen fehlt, wird der Repressor nicht gebildet. Daraus resultiert eine ungezügeltere sogenannte konstitutive Mehrproduktion der betroffenen Enzyme. Der Faktor, über den der Repressor mehrere Enzyme gleichzeitig beeinflussen kann, ist ebenfalls genetisch manifestiert und wird als Operator bezeichnet. Auch Mutanten, denen das Operatorgen fehlt, produzieren die entsprechenden Enzymproteine ungezügelt in großer Menge.

Unter Berücksichtigung dieser Hypothese könnte eine vermehrte oder verminderte Synthese bestimmter Enzyme durch Eingriffe in das Zusammenspiel des aus Repressor und Operator bestehenden und für die jeweiligen Enzyme elektiven regulatorischen Systems erklärt werden. Inaktivierung des Repressors kann zum Beispiel durch ein Überangebot des Stoffes erfolgen, für dessen Umsatz die betreffenden Enzyme notwendig sind. Das trifft wohl in erster Linie bei den katabolen Prozessen zu. So induziert Lactose bei *Escherichia coli* die Bildung von β -Galactosidase und weiterer Fermente, die den Abbau von Galactose katalysieren (3). Mit einem entsprechendem Mechanismus läßt sich auch die gesteigerte Synthese von Tryptophanpyrrolase deuten, die in der Leber des Warmblüters auftritt, wenn größere Mengen Tryptophan oder eines nahe verwandten Derivates appliziert werden. Mit der Induktion dieses Fermentes hat sich als erster der amerikanische Biochemiker Knox (4,5) eingehend beschäftigt und hat gezeigt, daß die intraperitoneale Injektion von 1g Tryptophan pro kg Körpergewicht bei Ratten die Konzentration der Tryptophanpyrrolase in der Leber innerhalb von 5 Stunden auf das Zehnfache steigert. Der Effekt tritt also relativ schnell ein und ist sehr deutlich ausgeprägt. Aus diesem Grunde eignet sich gerade dieses Enzym besonders gut für das Studium der induzierten Fermentsynthese.

Die Tryptophanpyrrolase kommt beim Säugetier nur in der Leber vor (6). Sie wurde aber auch in Mikroorganismen (7) und bei Insekten nachgewiesen (8). Sie katalysiert die oxydative Spaltung des Indolringes im Tryptophan (9), die mit der Bildung von Formylkynurenin einen wichtigen Abbauweg dieser

Aminosäure einleitet (Abb.1). Die Übertragung des Sauerstoffes auf das Molekül erfolgt direkt (10) und nicht, wie anfangs angenommen wurde, über die Bildung von Peroxyd, was dem Enzym den Namen "Tryptophan-Peroxydase-Oxydase" eingetragen hatte (5).

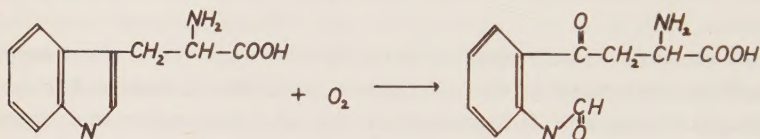


Abb.1: Oxydation von l-Tryptophan zu l-Formylkynurenin

Die Tryptophanpyrrolase ist ein Eisenprotoporphyrinprotein, dessen Eisenprotoporphyrinanteil leicht dissoziiert (11,12, 13) und wahrscheinlich die Funktion eines Coenzymes ausübt. Im partikelfreien Zellsaft der Leber ist nur ein Drittel des Apoenzymes mit dem Cofaktor verbunden, während zwei Drittel nicht aktiviert sind (12). Der Porphyrinfaktor befindet sich überwiegend in den Mikrosomen und zu einem geringen Teil auch in den Mitochondrien der Zelle und kann durch Kochen nicht zerstört werden (12,14).

Durch Inkubation des partikelfreien Leberzellsaftes von Ratten mit Mikrosomen wird die Apotryptophanpyrrolase in das Holoenzym überführt (12,14). Bezeichnet man den Mikrosomenanteil, der sich in einer bestimmten Lebermenge befindet, als ein Mikrosomenäquivalent, so sind drei bis vier Mikrosomenäquivalente notwendig, um das gesamte im Zellsaft derselben Lebermenge befindliche Apoenzym zu aktivieren (12). Ein Extrakt aus Lebermikrosomen ist wirksamer als die Mikrosomen selbst, da sie nur einen Teil ihres Protoporphyrinvorrates in den Zellsaft abgeben. An die Stelle von Mikrosomen und Mikrosomenextrakt kann auch Hämatin treten (12). Gekochter Zellsaft

von Lebern ausgewachsener Ratten und von Rattenfeten, sowie gekochter Zellsaft aus Muskeln, Gehirn, Erythrozyten oder verschiedenen anderen Organen, die alle keine Tryptophanpyrrolase enthalten, wirken wie Hämatin. (15,16) Diese Präparationen enthalten also einen Aktivator gleicher oder ähnlicher Zusammensetzung wie der in Lebermikrosomen.

Die Experimente, über die in der vorliegenden Arbeit berichtet wird, knüpfen an das an, was aus der Literatur über die Induktion der Synthese von Tryptophanpyrrolase bekannt ist. Insbesondere ist der Einfluß des Alters, der Rasse, der Fütterung und der endokrinen Drüsen auf die induzierte Enzymbildung untersucht worden.

Methodik:

a) Tiermaterial :

Alle Untersuchungen sind an Albinoratten durchgeführt worden, die vorher einige Zeit unter einheitlichen Bedingungen im Institut gehalten wurden.

b) Durchführung der Operationen :

In Äthernarkose wurde die beidseitige Adrenalektomie mindestens 6 Tage, die Orchidektomie und Ovariektomie 14 Tage und die Thyreo-Parathyreoidektomie 4 Wochen vor der Untersuchung der Tiere durchgeführt. Als Trinkwasser erhielten die adrenaletomierten Ratten 0,9 %ige Kochsalzlösung, thyreo-parathyreoidektomierte Tiere 1 %ige Calciumbrogluconatlösung und alle übrigen normales Leitungswasser ad libitum.

Adrenalektomie : Nach Anlegen eines 1-2 cm langen medianen Haut- und Fascienschnittes in Höhe der Nieren wurde die Rückenmuskulatur seitlich der Wirbelsäule mit einer spitzen, gebogenen Pinzette durchstoßen und durch Spreizen der letzteren stumpf getrennt. Durch die so geschaffene Öffnung wird das Fettgewebe in der Umgebung der am kranialen Nierenpol liegenden Nebenniere mit einer anderen gebogenen Pinzette erfaßt und vorsichtig in die Operationswunde gezogen. Die Pinzette, welche bis zu diesem Zeitpunkt die Muskelwunde offen hielt, ergreift nun das besagte Fettgewebe dicht unterhalb der zweiten Pinzette. Sie komprimiert die darin verlaufenden Nebennierengefäße, so daß die oberhalb liegende Nebenniere mit ihrer Kapsel gefahrlos entfernt werden kann. Diese Methode ermöglicht eine Operation ohne Eröffnung des Peritoneums. Die Elastizität der dicken Rückenmuskulatur macht eine Adaptation durch Naht überflüssig, so daß nur die äußere Haut mit Michelklammern verschlossen werden muß.

Ovariektomie : Die Eröffnung der Bauchhöhle erfolgte wie bei der Adrenalektomie. Dabei wurde das Peritoneum durchtrennt,

und die Ovarien wurden mit dem Eileiter und den Spitzen der Uterushörner entfernt. Das Uterushorn, das Mesometrium, das Mesovar und die Mesosalpinx jeder Seite wurden vorher mit einer Massenligatur abgebunden, um Blutungen zu verhindern.

Orchidektomie : Hoden und Nebenhoden wurden bei eröffneter Tunica vaginalis, nach der Durchtrennung des Nebenhodenschwanzbandes und Unterbindung des Samenstranges abgesetzt. Danach wurde Penicillin-Sulfonamid-Puder eingestreut und die Scrotalwunde mit Michelklammern zur Vermeidung von Sekretstauung unvollständig verschlossen.

Thyreo-Parathyreoidektomie : Durch Hautschnitt und stumpfe mediane Präparation der ventralen Halsmuskulatur wurde die Trachea vom Larynx bis zum Manubrium sterni freigelegt. Ein federnder Wundspreizer hielt die Wunde offen. Nach Unterbindung der Gefäße, die von kranial und kaudal in die Schilddrüse einmündeten, wurde diese von der darunterliegenden Trachea abpräpariert und die als kleine Insel darauf sitzende Nebenschilddrüse mit entfernt. Dabei war der dort verlaufende Nervus recurrens sorgfältig zu schonen, da sonst Atembeschwerden durch ein- bzw. beidseitige Lähmung der Kehlkopfmuskulatur auftreten können. Ein Klammerverschluß der Hautwunde reichte aus, wenn anfangs sauber präpariert worden war.

c) Verabreichte Substanzen :

Zur Induktion der Tryptophanpyrrolase wurden DL-Tryptophan, Cortisonacetat[®] oder beides verwendet. Die gesamte DL-Tryptophan- bzw. Cortisonosis wurde in 4 ml einer 1 %igen Gummiarabicum-Lösung aufgeschwemmt und intraperitoneal injiziert.

Methenolonönanthat[®] (1-Methyl- Δ^1 -androst-17 β -ol-3-on-17-ön-anthat), ein von der Firma Schering A.G., Berlin, als Primo-

* Cortisonacetat und Methenolonönanthat stellte die Firma Schering A.G., Berlin, auf Vermittlung von Herrn Dr. Kramer freundlicherweise zur Verfügung.

bolan-Depot^o in den Handel gebrachtes Anabolicum, wurde in die Muskulatur des Hinterschenkels injiziert. 1 ml der öli= gen Lösung enthielt 25 mg Substanz. Wenn das insgesamt ver= abreichte Volumen 0,5 ml überschritt, wurde es auf mehrere Injektionsstellen verteilt. Die Kontrollen erhielten intra= muskulär eine entsprechende Menge Sesamöl.

d) Herstellung des Homogenates zur Bestimmung der Tryptophan= pyrrolaseaktivität : -----

Nach Betäubung der Ratten durch einen Schlag auf den Kopf, anschließender Dekapitation und gründlicher Ausblutung wurde die Leber entnommen, 1-2 g davon abgewogen und in der sieben= undzwanzigfachen Menge einer gekühlten Pufferlösung mit dem "Ultra-Turrax" 1 Minute lang unter Kühlung homogenisiert.

Die Pufferlösung enthielt:

2 Teile 0,2 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,2

1 Teil 1,21 %ige KCl-Lösung

Darin waren 0,003 mol/l L-Tryptophan, das Substrat der Tryp= tophanpyrrolase, gelöst. Der Substratzusatz stabilisiert die Tryptophanpyrrolase, deren Aktivität andernfalls in vitro absinkt.

Erfolgte die Bestimmung unter Zusatz des Coenzyms, so wurden je 10 ml dieser Lösung mit 0,04 ml einer 500 μ molaren Lösung von Hämatin^o in 1/125 normaler KOH versetzt, so daß eine 2 μ molare Enakonzentration von Hämatin vorlag. Nur bei Unter= suchungen mit verschiedenen Hämatingkonzentrationen im Homoge= nat wurde das Hämatin erst nach dem Homogenisieren hinzuge= fügt.

e) Bestimmung der Tryptophanpyrrolaseaktivität :

15 ml des Homogenates kamen in ein vorgekühltes 25 ml- Erlen=

* Für die Überlassung des Hämamins bin ich den Nordmark-Wer= ken G.m.b.H. Hamburg sehr zu Dank verpflichtet.

meyerkölbchen. Die Inkubation erfolgte unter ständigem Schütteln in einem Wasserbad bei 38°C und 1 Atmosphäre Sauerstoffdruck. Nach 20 und nach 50 Minuten wurden je 4 ml entnommen und in je ein vorbereitetes Zentrifugenglas pipettiert, das 0,4 ml 45 %ige HClO_4 enthielt. Die auftretende Fällung wurde abzentrifugiert, und 3 ml des Überstandes wurden mit 0,5 ml 4 n KOH und 0,5 ml 3 m KHCO_3 -Lösung auf pH 6,5 - 7,0 gebracht. Bei $+4^{\circ}\text{C}$ bildete sich erneut ein Niederschlag, der sich abfiltrieren ließ. Die Extinktion des klaren Filtrates wurde mit dem Filter Hg 366 nm im Eppendorffphotometer gemessen.

Der Extinktionsanstieg von 20 bis 50 Minuten ist durch die Erhöhung der Kynureninkonzentration im Homogenat bedingt. Daraus läßt sich die Aktivität der Tryptophanpyrrolase errechnen, die ausdrückt, wieviel Kynurenin pro Gramm Leberfrischgewicht innerhalb einer Stunde ($\mu\text{mol/g/h}$) gebildet wird. Obwohl Tryptophan durch die Tryptophanpyrrolase nicht direkt zu Kynurenin, sondern zunächst zu Formylkynurenin oxydiert wird, kann die Kynureninbildung zur Ermittlung der Pyrrolaseaktivität herangezogen werden, weil Formylkynurenin durch eine Formylase rasch gespalten wird, die in 600-fachem Überschuß in der Leber vorkommt (17).

f) Bestimmung der Evipanabbaugeschwindigkeit :

Die Bestimmung erfolgte mit einer von Remmer modifizierten Methode, die Brodie, Bruns, Mark, Lief, Bernstein und Papper eingeführt haben (18).

Zu 3 ml eines 16,7 %igen Leberhomogenates, hergestellt in einem Medium aus 77 Teilen 1,1 %iger KCl-, 3 Teilen 5,5 %iger Glucose- und 20 Teilen m/15 Phosphatpufferlösung von pH 7,4, wurden 3mg Magnesiumsulfat, 12 mg Nicotinsäureamid, 0,25 mg TPN und 2 μmol Evipan, zusammen in 2 ml m/15 Phosphatpuffer gelöst, gegeben und dieser Ansatz von 5 ml bei 38°C 30 Minuten lang inkubiert. Beim anschließenden Ausschütteln von 3 ml Inkubationsansatz mit 20 ml Petroläther, dem 0,3 ml Isoamylalkohol zugesetzt waren, geht das Evipan selbst in das Lipoidlösungsmittel über, während die Oxydationsprodukte zum

größten Teil in der wässrigen Phase bleiben. Nach dem Zentrifugieren wurden 15 ml evipanhaltigen Petroläthers mit 5 ml Phosphatpuffer von pH 11 5 Minuten geschüttelt. Danach befindet sich das Evipan in der wässrigen Phase und die restlichen Oxydationsprodukte bleiben im überstehenden Petroläther. Die Extinktion des evipanhaltigen Puffers wurde im Zeiß-Spectrophotometer bei den Wellenlängen 245, 255 und 270 $m\mu$ gegen Pufferlösung gemessen. Nebenher wurde ein Ansatz, der alles außer der Leber enthielt, den gleichen Prozeduren unterworfen. In diesem sogenannten Eichansatz fand also kein Evipanabbau statt. Somit kann aus der Extinktionsdifferenz zwischen Meß- und Eichwert der Evipanschwind in Prozent bzw. in $\mu\text{mol/g Leber/h}$ errechnet werden, der ein Maß für die Aktivität der TPN-abhängigen Arzneimittel oxydierenden Enzyme darstellt.

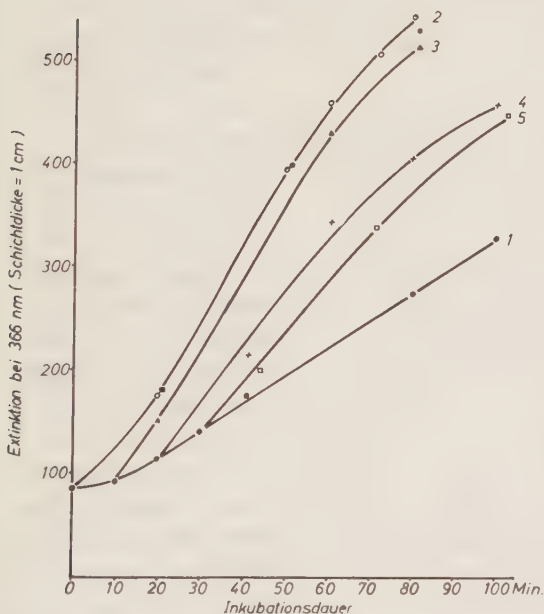
g) Herstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen :

Ga. 1 mm^3 große Leberstückchen wurden in einer 1 %igen Lösung von OsO_4 in Veronal-Acetat-Puffer (pH 7,4) mit Saccharosezusatz fixiert, nach Acetonentwässerung in Vestopal eingebettet und mit LKB- und Porter-Blum-Mikrotomen geschnitten. Zur Kontrastierung wurden Uranylacetat oder Bleihydroxyd verwendet. Die Photographien wurden mit dem Siemenselmiskop I (Strahlspannung 80 kV) aufgenommen. Sie entstanden in Zusammenarbeit mit Herrn Priv.-Doz. Dr. Merker von der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie des Anatomischen Institutes der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Ergebnisse :

a) Aktivierung der Tryptophanpyrrolase durch Hämatin im Leberhomogenat-----

Den Ausgangspunkt der ersten Versuchsreihe bildeten die Befunde von Feigelson und Greengard (12) über die Aktivierung der Tryptophanpyrrolase durch Mikrosomen im partikelfreien Zellsaft von Rattenlebern, die in der Einleitung erwähnt sind.

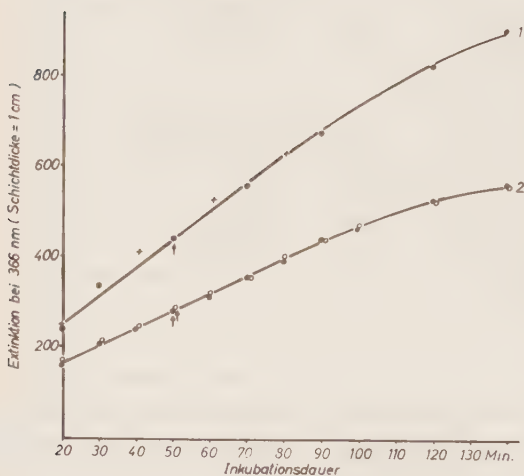


Die Kurven in den Abbildungen 2 bis 4 und die Werte im Tabelle 2 zeigen, daß Hämatin die Aktivität der Tryptophanpyrrolase steigert. Wahrscheinlich reicht der Cofaktorgehalt des Leberhomogenates nicht zur Sättigung des darin enthaltenen Enzyms aus. Durch $2 \mu\text{mol}$ Hämatin pro Liter kann der Mangel ausgeglichen werden (Abb. 2 und 3), und das ge=

Abb.2: Wirksamkeit von Hämatin im Leberhomogenat bei der Aktivierung der Tryptophanpyrrolase in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe.

- | | |
|---|--|
| (1) • ohne Zusatz von Hämatin | |
| (2) ○ $2 \mu\text{mol/l}$ Hämatin | } vor Beginn der Inkubation
zugesetzt. |
| ■ $4 \mu\text{mol/l}$ Hämatin | |
| (3) ▲ $2 \mu\text{mol/l}$ Hämatin 10 Min. | } nach Beginn der Inkubation
zugesetzt. |
| (4) + $2 \mu\text{mol/l}$ Hämatin 20 Min. | |
| (5) □ $2 \mu\text{mol/l}$ Hämatin 30 Min. | |

samte Enzym ist aktiviert. Eine weitere Erhöhung der Hämatinkonzentration auf das Doppelte oder Fünffache ruft keine stärkere Wirkung hervor (Abb.2 und 5) Dies trifft auch für das Enzym tryptophaninduzierter Ratten zu (Abb.5). Allerdings verzögerten $4 \mu\text{mol/l}$ Hämatin das Absinken der Reaktionsgeschwindigkeit bei dem Enzympräparat, welches aus der Leber des am stärksten induzierten Tieres hergestellt worden war. In dem üblichen Meßintervall zwischen der 20. und der 50. Minute nach Inkubationsbeginn machte sich dieser Effekt noch nicht bemerkbar, so daß auch in jenem Homogenat $2 \mu\text{mol/l}$ Hämatin zur Aktivitätsbestimmung ausreichten. $10 \mu\text{mol/l}$ beeinflussten den Reaktionsverlauf nicht.



Das Hämatin ist desto wirksamer, je früher es nach dem Töten und der Leberentnahme zugesetzt wird, später zugefügt, läßt der Effekt rasch nach. Längere Zeit ohne Cofaktor in Lösung gehaltenes Apoenzym kann durch Hämatin nicht mehr aktiviert werden (Abb. 2 bis 4). Die Enzympräparate,

Abb.3: Wirksamkeit von Hämatin bei der Aktivierung der Tryptophanpyrrolase 50 Minuten nach Inkubationsbeginn.

- (1) + $2 \mu\text{mol/l}$ Hämatin vor Beginn der Inkubation zugesetzt.
- $2 \mu\text{mol/l}$ Hämatin vor Beginn der Inkubation zugesetzt und 50 Minuten nach Beginn der Inkubation auf $4 \mu\text{mol/l}$ ergänzt.
- (2) • $2 \mu\text{mol/l}$ Hämatin 50 Minuten nach Beginn der Inkubation zugesetzt.
- $4 \mu\text{mol/l}$ Hämatin Inkubation zugesetzt.

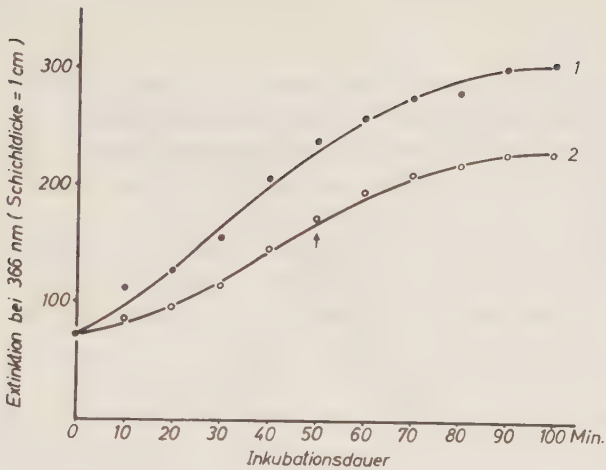


Abb.4: Wirksamkeit von $10 \mu\text{mol/l}$ Hämatin bei der Aktivierung der Tryptophanpyrrolase im Leberhomogenat.
(1) ● vor Beginn der Inkubation zugesetzt
(2) ○ 50 Minuten nach Beginn der Inkubation zugesetzt.

deren katalytische Wirkung in den Abbildungen 2 bis 5 dargestellt ist, waren, bevor sie in das Wasserbad von 38°C kamen, auf 0°C abgekühlt worden, so daß zum Temperatenausgleich einige Zeit erforderlich war, die mit ca. 10 Minuten angesetzt werden kann. So erklärt sich, daß 10 Minuten nach Inkubationsbeginn zugesetztes Hämatin voll wirksam ist, aber bereits nach 20 oder 30 Minuten zugefügt, ist der Effekt des Hämamins erheblich schwächer (Abb.2). Erfolgt die Zugabe erst nach 50 Minuten, so ist keine Aktivierung mehr nachweisbar (Abb.3). Auch dann verhilft die fünffache Konzentration nicht zu einer sichtbaren Aktivitätssteigerung (Abb.4). In Verbindung mit dem Cofaktor ist das Enzym also wesentlich stabiler als in freier Form, so daß der Zusatz von Hämatin zur Ermittlung der vollständigen Menge des Apoenzyms erforderlich ist.

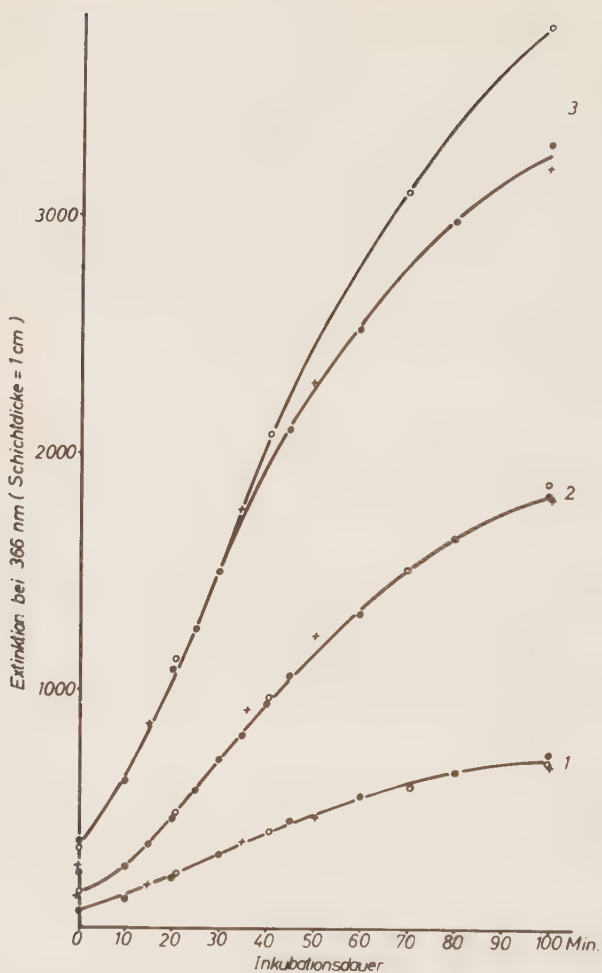


Abb. 5: Reaktionsverlauf der Tryptophanpyrrolasekatalyse bei verschiedenen Hämatingonzentrationen im Leberhomogenat von einer unbehandelten Ratte und von tryptophan-induzierten Ratten.

(1) unbehandelt, (2) 5 Stunden nach der i.p. Injektion von 0,5 g/kg DL-Tryptophan, (3) 5 Stunden nach der i.p. Injektion von 1,5 g/kg DL-Tryptophan

• 2 μ mol/l, ○ 4 μ mol/l und + 10 μ mol/l Hämatin vor dem Homogenisieren zugegeben.

b) Abhängigkeit der Tryptophanpyrrolaseaktivität von der Rasse, dem Geschlecht und dem Körpergewicht bzw. vom Lebensalter der Ratten.

In der folgenden Untersuchungsreihe wurde ermittelt, ob Ratten, die aus verschiedenen mit A,B,C und D bezeichneten Bezugsquellen stammen, Unterschiede in der Aktivität der Tryptophanpyrrolase aufweisen. Die aus verschiedenen Quellen beschafften Tiere gehören verschiedenen Rassen an. Gruppe A wurde aus Beständen der Firma Schering A.G., Berlin, bezogen, Gruppe B von einem Tierhändler in Berlin. Gruppe C ist ein Inzuchtprodukt aus dem Institut für Zellforschung der Max-Planck-Gesellschaft in Berlin. Gruppe D kommt aus einem Inzuchtstamm der Firma Reupohl in Lage/Westf., der die Firmenbezeichnung R 57 trägt.

	Körpergewicht in g	A	B	C	D
♀	100 - 150	$0,69 \pm 0,33$ (6)			$0,73 \pm 0,32$ (25)
	150 - 200		$0,95 \pm 0,57$ (18)	$1,48 \pm 0,64$ (17)	$1,24 \pm 0,57$ (34)
	200 - 250	$2,41 \pm 0,88$ (37)	$1,20 \pm 0,61$ (6)		$1,59 \pm 0,62$ (13)
♂	150 - 200			$1,35 \pm 0,28$ (18)	$1,12 \pm 0,54$ (11)
	über 250	$2,00 \pm 0,96$ (9)		$2,11 \pm 0,49$ (12)	

Tabelle 1: Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$ von männlichen und weiblichen Ratten verschiedenen Gewichtes und von verschiedenen Bezugsquellen (A,B,C,D).

• significant höher als weibl. Tiere der gleichen Gewichtsklasse von anderen Bezugsquellen. () Anzahl der untersuchten Tiere

Zwischen den verschiedenen Rassen fanden sich gewisse Unterschiede in der Tryptophanpyrrolaseaktivität, die aus den Werten der Tabelle 1 abzulesen sind. Bei Anwendung statistischer Rechenmethoden ist allerdings nur bei Weibchen mit mehr als 200 g Körpergewicht eine gesicherte Differenz festzustellen. Die Aktivität der Ratten aus der Gruppe A übertrifft hier die der anderen Gruppen erheblich, $P < 0,01$. Die Unterschiede bei den anderen Gewichtsklassen sind weniger stark ausgeprägt; aber auch sie zeigen, daß für vergleichende Untersuchungen möglichst einheitliches Tiermaterial verwendet werden muß.

Aus diesen Untersuchungen geht bereits deutlich die Altersabhängigkeit der Enzymaktivität hervor. Das Gewicht kann unter den gegebenen einheitlichen Haltungsbedingungen in begrenztem Umfang als Anhaltspunkt für das Alter der Tiere gelten, soweit sie gleicher Herkunft und damit genetisch einigermaßen einheitlich sind. Doch ist die Gewichtsentwicklung bei den Geschlechtern nicht gleich. In der Regel wachsen weibliche Tiere langsamer als männliche (Vergleiche Abb. 10). Bei den meisten Arten werden die Männchen auch größer als die Weibchen. Folglich sind gleichschwere Tiere nicht ohne weiteres als gleichaltrig zu betrachten. Die Altersbestimmung auf Grund des Körpergewichtes wird selbstverständlich in dem Abschnitt der Entwicklung besonders unzuverlässig, der dem abgeflachten, späteren Teil der Gewichtskurve entspricht, der vor dem Wachstumsabschluß liegt. Z.B. waren von den in Tabelle 1 aufgeführten Tieren die schwersten der Gruppe A die ältesten von allen. Sie waren bereits ausgewachsen, als sie gekauft wurden, blieben dann aber noch mehrere Monate im Institutsstall, bevor sie zur Untersuchung kamen. Alle anderen Ratten dagegen wurden übernommen, bevor ihr Wachstum abgeschlossen war, und untersucht, sobald sie das gewünschte Gewicht erreicht hatten:

Daraus ergibt sich, daß die Unterschiede zwischen gleichschweren Tieren verschiedener Rassen nicht genetisch bedingt sein müssen, sondern eher auf das verschiedene Alter zurückgeführt werden können. Die Altersabhängigkeit der Tryptophanpyrrolaseaktivität kommt in Tabelle 2 noch besser zum Aus-

Körperge- wicht in g	a) ♂ b)	a) ♀ b)	P
100 - 150	$0,88 \pm 0,44$ (41) $2,14 \pm 0,75$ (8)	$0,74 \pm 0,33$ (45) $1,90 \pm 0,84$ (18)	$>0,05$ $>0,05$
150 - 200	$1,26 \pm 0,42$ (29) -	$1,28 \pm 0,43$ (69) $2,13 \pm 0,67$ (9)	$>0,05$
mehr als 200	$1,94 \pm 0,71$ (68) $2,87 \pm 0,86$ (30)	$2,03 \pm 0,88$ (71) $2,86 \pm 0,93$ (17)	$>0,05$ $>0,05$

Tabelle 2: Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$ von Ratten verschiedenen Geschlechtes und verschiedenen Körpergewichtes.

a) ohne, b) mit Hämatinzusatz zum Homogenat ermittelt. () Anzahl der untersuchten Tiere.

druck als in Tabelle 1. Mit zunehmendem Lebensalter steigt die Aktivität an, aber die Differenz zwischen den Werten, die ohne, und denen, die mit Hämatinzusatz ermittelt wurden, nimmt ab. In der Gruppe der kleineren Tiere aktiviert Hämatin das Enzym auf das 2,5-Fache, bei den schwersten Tieren erfolgt diese Steigerung nur auf das 1,5-Fache. In der Leber junger, wachsender Tiere ist also, verglichen mit älteren Tieren, relativ weniger Cofaktor enthalten, oder es wird von den Zellorganellen festgehalten und reagiert deshalb nicht mit dem in Lösung befindlichen Apoenzym.

Die Aktivität der Tryptophanpyrrolase wird vom Geschlecht der Tiere nicht beeinflusst, wie besonders aus den Ergebnissen in Tabelle 2 zu ersehen ist.

c) Induktive Mehrbildung der Tryptophanpyrrolase.

Zur Anreicherung der Tryptophanpyrrolaseaktivität in der Leber, die zumindest partiell als Induktion der Synthese gedeutet werden kann, wurde DL-Tryptophan oder Cortisonacetat verwendet. Durch intraperitoneale Injektion von 1g/kg DL-Tryptophan wird die Aktivität der Tryptophanpyrrolase in der Leber stark erhöht. Tabelle 3 zeigt, daß Alter und Geschlecht diesen Effekt auf die Enzymaktivität nicht beeinflussen.

Körperge- wicht in g	♀		♂	
	a)	b)	a)	b)
100 - 200	12,2 ± 4,7 (26)	19,0 ± 3,6 (19)	13,6 ± 6,3 (17)	-
mehr als 200	11,4 ± 4,2 (26)	-	11,8 ± 2,4 (17)	19,0 ± 0,5 (3)

Tabelle 3: Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$ 5 Stunden nach der i.p. Injektion von 1g/kg DL-Tryptophan bei Ratten verschiedenen Geschlechtes und Körpergewichtes.

a) ohne, b) mit Hämatinzusatz zum Homogenat ermittelt. () Anzahl der untersuchten Tiere.

Die höchste mit Tryptophan innerhalb von 5 Stunden bei Ratten erreichbare Tryptophanpyrrolaseaktivität liegt etwa bei 17 bis 19 $\mu\text{mol/g/h}$. Bis zu 1,5 g/kg ist ohne Hämatinzusatz eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erkennen. Darüber liegende Dosen haben auf den 5-Stunden-Wert keinen stärkeren Effekt. Wird das Enzym jedoch mit Hämatin gesättigt, so ist das Maximum schon bei 1g/kg erreicht. Nach 5 Stunden ist die Aktivität folglich etwa auf das Zehnfache gesteigert (Abb. 6). Nach 8 Stunden klingt der Effekt von 1 g / kg Tryp=

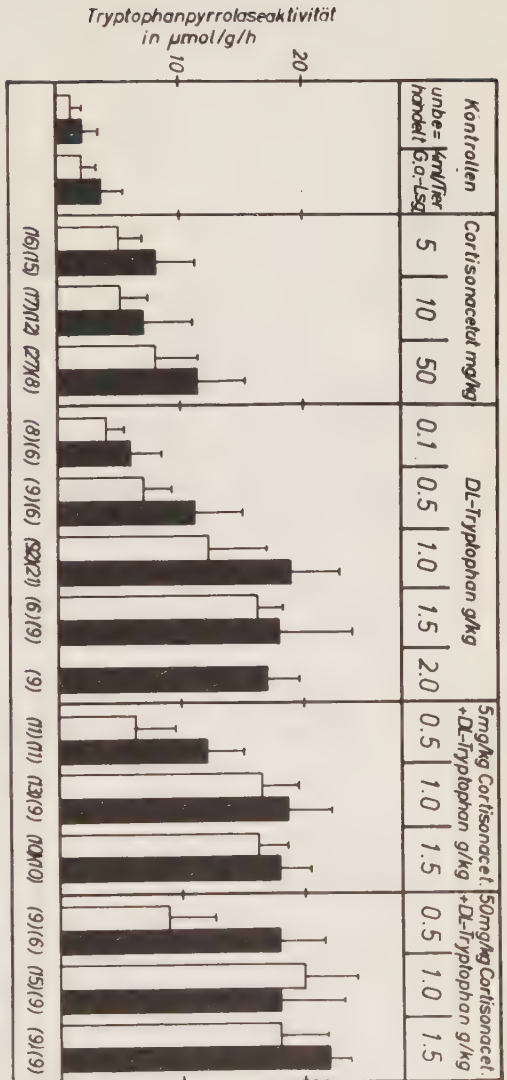


Abb.6: Tryptophanpyrrolaseaktivitäten von intakten Ratten 5 Stunden nach der i.p. Injektion verschiedener DL-Tryptophan- oder Cortisonacetat-dosen bzw. nach der kombinierten Verabreichung der beiden Stoffe.

□ ohne Hämatinzusatz, ■ mit Hämatinzusatz zum Homogenat ermittelt. () Anzahl der untersuchten Tiere.

tophan bereits ab. Dagegen reichert sich die Tryptophanpyrrolase bis zur 8. Stunde nach 2g/kg weiterhin an (Abb.7). Sie betrug mit $37 \mu\text{mol/g/h}$ etwa das Zwanzigfache der normalen Aktivität. Nach 12 Stunden hatte auch die Wirkung von 2 g/kg DL-Tryptophan nachgelassen. Die Aktivität lag aber immer noch bei $21,6 \mu\text{mol/g/h}$.

Jedoch ist die Anpassungsfähigkeit der Leber damit noch nicht erschöpft. Unter extremen Bedingungen kann sie noch mehr Tryptophanpyrrolase bilden. Nach viermaliger intraperitonealer Injektion von 1g/kg DL-Tryptophan in 4,5-stündigen Abständen wurde 22,5 Stunden nach der ersten bzw. 4,5 Stunden nach der letzten Injektion das Fünfunddreißig- bis Vierzigfache der Normalaktivität gemessen. Der Mittelwert von vier Tieren betrug $71,5 \pm 11,7 \mu\text{mol/g/h}$ (Abb.7). Diese Tiere befanden sich in einem äußerst schlechten Gesundheitszustand und hätten vielleicht weitere 4,5 Stunden nach einer neuerlichen Injektion nicht überstanden. Einige Tiere starben vorzeitig während dieser Behandlung. Aber auch bei einmaliger Behandlung war DL-Tryptophan schon ziemlich toxisch. Die behandelten Ratten zeigten die Symptome einer akuten Kreislaufschwäche, die sich nach den höheren Dosen stärker als nach den niedrigeren bemerkbar machten.

	unbehandelt	4 ml 0,9%ige NaCl - Lsg.	4 ml 1%ige Gum.-ar.-Lsg.	P
♀ 150-200 g	$1,26 \pm 0,42$ (69)	$1,48 \pm 0,66$ (8)	$2,16 \pm 1,30$ (30)	•
♂ 100-150 g	$0,90 \pm 0,44$ (36)	-	$1,90 \pm 0,56$ (17)	$< 0,01$

Tabelle 4: Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$ 5 Stunden nach der i.p. Injektion von 4 ml 1 %iger Gummi-arabicum-Lösung bzw. 4 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung.
()Anzahl der untersuchten Tiere. • Die Erhöhung der Tryptophanpyrrolaseaktivität nach i.p. Injektion von Gummi-arabicum-Lösung ist significant, $P < 0,01$.

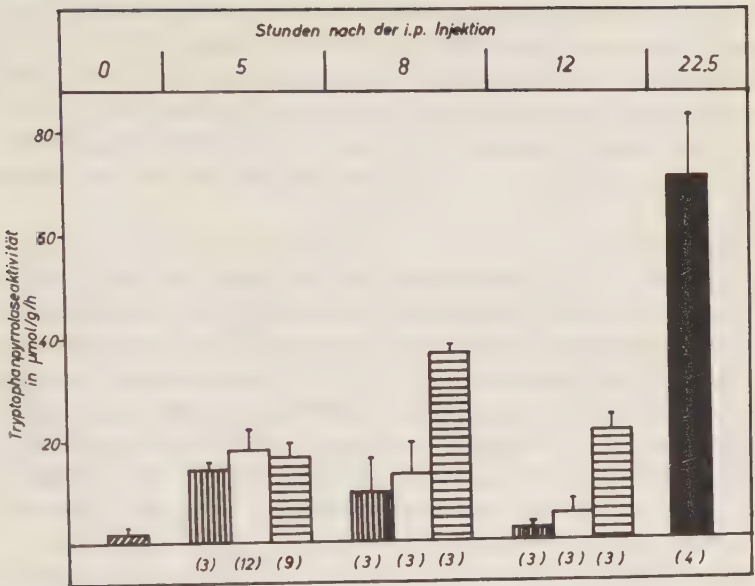


Abb.7: Tryptophanpyrrolaseaktivität zu verschiedenen Zeiten nach der i.p. Injektion verschiedener DL-Tryptophan-dosen.

Alle Aktivitäten wurden mit Hämatinzusatz zum Leberhomogenat ermittelt. () Anzahl der untersuchten Tiere.



unbehandelt



0,5 g/kg



1,0 g/kg



2,0 g/kg



4 x 1,0 g/kg DL-Tryptophan i.p.: Erste Injektion im Zeitpunkt 0, alle weiteren in 4,5-stündigen Abständen. Bestimmung der TPO-Aktivität: 4,5 Stunden nach der vierten bzw. 22,5 Stunden nach der ersten Injektion. Jede Einzeldosis in 3 ml Gummi-arabicum-Lsg. aufgeschw.

Das Allgemeinbefinden solcher Tiere, denen nur 4 ml einer 1 %igen Gummi-arabicum-Lösung intraperitoneal verabreicht wurden, blieb ungestört. Jedoch verdoppelte sich auch bei ihnen die Tryptophanpyrrolaseaktivität innerhalb von 5 Stunden (Tab.4). 4 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung verändern die Enzymaktivität nach intraperitonealer Injektion nicht, so daß nicht das Flüssigkeitsvolumen, sondern der Gehalt an Gummi arabicum für den Effekt verantwortlich gemacht werden muß.

Außer durch Tryptophan kann eine Anreicherung der Tryptophanpyrrolase auch mit Cortison erzielt werden. Das Maximum nach 5 Stunden liegt bei $13 \mu\text{mol/g/h}$ und wurde mit 50 mg/kg Cortisonacetat erreicht. Dies entspricht der sechs- bis siebenfachen Normalaktivität und bleibt damit weit unterhalb der mit höchsten Tryptophandosen erzielten Aktivitätssteigerung. 5 Stunden nach der Injektion ist der Effekt von 50 mg/kg Cortisonacetat erheblich stärker als der von 5 und 10 mg/kg. Zwischen den Wirkungen von 5 und 10 mg/kg ist nach dieser Zeit kein Unterschied festzustellen (Abb.6).

Cortisonacetat mg/kg	Tryptophanpyrrolaseaktivität nach	
	3,5 Stunden	8 Stunden
5,0	$8,2 \pm 1,5$ (3)	$6,0 \pm 2,3$ (3)
10,0	$11,0 \pm 2,0$ (3)	$8,1 \pm 1,6$ (3)
100,0	$12,3 \pm 2,6$ (3)	$19,9 \pm 3,5$ (3)

Tabelle 5 : Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$
3,5 und 8 Stunden nach 5, 10 und 100 mg/kg
Cortisonacetat i.p.

Alle Aktivitäten wurden mit Hämatinzusatz zum Homogenat ermittelt. () Anzahl der untersuchten Tiere.

Wie mit Tryptophan kann die Tryptophanpyrrolaseaktivität mit Cortisonacetat durch Aufrechterhaltung hoher Konzentrationen im Organismus nach 5 Stunden weiterhin gesteigert werden (Tab.5). So wurde 8 Stunden nach der intraperitonealen Injektion von 100 mg/kg eine Aktivität von $19,9 \pm 3,5 \mu\text{mol/g/h}$ gegenüber $12,3 \mu\text{mol/g/h}$ nach 3,5 Stunden gemessen. Die Wirkung von 5 und 10 mg/kg Cortisonacetat war nach 8 Stunden bereits abgeklungen.

Die Kombination von Tryptophan mit 5 mg/kg Cortisonacetat führt bei intakten Ratten nicht zur Addition der induzierenden Wirkungen, sondern geht über die nach Tryptophan allein auftretende Anreicherung nicht hinaus. Auch wenn die zehnfache Cortisonmenge, nämlich 50 mg/kg, mit DL-Tryptophan kombiniert wird, ist keine eklatante Wirkungssteigerung zu beobachten. Lediglich die Wirkung der kleinen Tryptophandosis wird deutlich verstärkt. Aber von einer Addition der Effekte kann auch hier keine Rede sein.

d) Bedeutung der Nebennieren für die Induktion durch Tryptophan und Cortison.-----

Durch Adrenalektomie wird die Tryptophanpyrrolaseaktivität um 30 - 40 % vermindert, was bei den jungen Tieren erst durch die unter Hämatinzusatz erfolgten Bestimmungen deutlich zum Ausdruck kommt. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Altersgruppen sind nach der Adrenalektomie fast verschwunden, so daß die Differenzen zumindest teilweise auf Faktoren zurückgeführt werden können, die mit der Funktion der Nebennieren zusammenhängen.

Der induzierende Effekt von Cortison und Tryptophan ist bei adrenalektomierten Tieren erheblich abgeschwächt. Während aber bei Cortison noch eine Dosis-Wirkungs-Beziehung besteht, tritt diese beim Tryptophan nur geringfügig in Erscheinung. Die Wirkung hoher Tryptophandosen ist stärker abgeschwächt als die kleiner Dosen. Die mit und ohne Hämatin bestimmten Enzymaktivitäten unterscheiden sich bei den tryptophanbehandelten Tieren kaum. Bei adrenalektomierten Ratten tritt eine Addition der Effekte von Cortisonacetat und Tryptophan nach

	Körperge- wicht in g	intakt		adrenalektomiert		P
		a)	b)	a)	b)	
♂	100-150	$0,89 \pm 0,44$ (41)	$2,14 \pm 0,75$ (8)	$0,86 \pm 0,35$ (12)	$1,51 \pm 0,38$ (12)	$> 0,05$ $< 0,025$
	150-200	$1,26 \pm 0,42$ (29)		$0,90 \pm 0,43$ (16)		$< 0,01$
♀	100-150	$0,74 \pm 0,33$ (45)	$1,90 \pm 0,84$ (18)	$0,86 \pm 0,31$ (24)	$1,39 \pm 0,36$ (13)	$> 0,05$ $< 0,025$
	150-200	$1,28 \pm 0,43$ (69)		$0,71 \pm 0,09$ (6)		$< 0,01$
	mehr als 200	$2,03 \pm 0,88$ (71)		$1,31 \pm 0,37$ (8)		$< 0,025$

Tabelle 6: Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$ bei männlichen und weiblichen Ratten nach der Adrenalektomie.

a) ohne, b) mit Hämatinzusatz zum Homogenat ermittelt. () Anzahl der untersuchten Tiere.

der kombinierten Verabreichung auf, die bei intakten Tieren nicht beobachtet wurde (Abb.8).

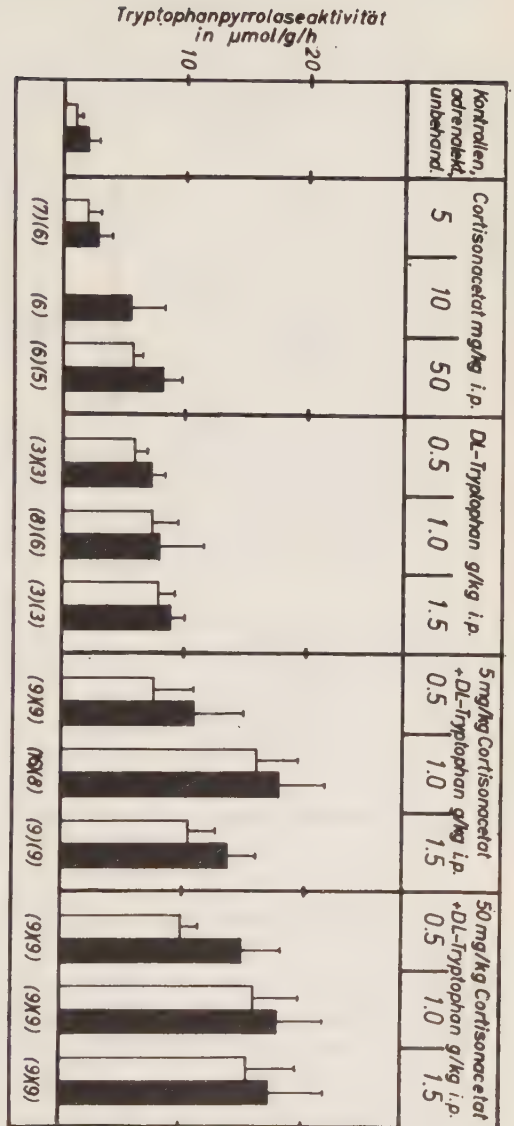


Abb. 8: Tryptophanpyrrolaseaktivitäten von adrenalectomierten Ratten 5 Stunden nach der i.p. Injektion verschiedener DL-Tryptophan- oder Cortisonacetatdosen bzw. nach kombinierter Verabreichung der beiden Stoffe.

◻ ohne Hämatinzusatz, ◻ mit Hämatinzusatz zum Homogenat ermittelt. () Anzahl der untersuchten Tiere.

e) Einfluß der Gonaden auf die Induktion der Tryptophanpyrrolase.-----

Obwohl sich die Tryptophanpyrrolaseaktivität bei weiblichen und männlichen Ratten nicht unterscheidet, wirkt sich die Entfernung der Gonaden bei den Geschlechtern verschieden aus.

Körpergewicht in g	intakt		ovariekтомiert		P
	a)	b)	a)	b)	
100-150	0,74±0,33 (45) 1,90±0,84 (18)		0,69±0,13 (10) 1,15±0,20 (6)		>0,05 <0,025
150-200	1,28±0,43 (69) 2,13±0,67 (9)		1,04±0,38 (15) 2,27±0,88 (14)		<0,025 >0,05
mehr als 200	2,03±0,88 (71) 2,86±0,93 (17)		0,98±0,38 (39) 1,63±0,76 (13)		<0,01 <0,01

Tabelle 7: Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$ bei weiblichen Ratten nach der Ovariektomie.

a) ohne, b) mit Hämatinzusatz zum Homogenat gemessen. () Anzahl der untersuchten Tiere.

Nach der Ovariektomie tritt bei den weiblichen Ratten, die über 200 g wiegen, eine starke Verminderung der Enzymaktivität ein. Bei den leichten Tieren ist dieser Effekt weniger stark und bei den mittelschweren ovariekтомierten Ratten nur bei der ohne Hämatin gemessenen Aktivität ausgeprägt (Tab.7). Die Kastration der männlichen Ratten hat keine Folgen für die Konzentration des Apoenzyms in der Leber (Tab.8). Zwar liegt

Körper= gewicht in g	intakt		orchidektomiert		P
	a)	b)	a)	b)	
100-150	0,88±0,44 (41)		0,91±0,44 (21)		> 0,05
		2,14±0,75 (8)		2,48±0,92 (16)	> 0,05
mehr als 200	1,94±0,71 (68)		1,54±0,40 (20)		< 0,01
		2,87±0,86 (30)		3,06±0,90 (15)	> 0,05

Tabelle 8: Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$ bei männlichen Ratten nach der Orchidektomie.

a) ohne, b) mit Hämatinzusatz zum Homogenat gemessen. () Anzahl der untersuchten Tiere.

bei den kastrierten männlichen Ratten der a-Wert in der Gruppe der über 200 g schweren Tiere ebenfalls deutlich niedriger als bei den nichtoperierten Kontrolltieren, aber der Unterschied wird durch den Hämatinzusatz beseitigt. Folglich handelt es sich hier sicher um etwas anderes als bei den weiblichen Tieren. Vielleicht ist die Differenz in diesem Fall durch einen Mangel an Cofaktor oder dessen verminderte Freisetzung bedingt.

Die Induzierbarkeit des Enzyms wird durch die Kastration weder bei männlichen, noch bei weiblichen Tieren beeinflusst (Tab.10). So besteht insbesondere bei männlichen Tieren kein Anhalt für eine Mitwirkung der Geschlechtshormone bei der Regulation der Biosynthese von Tryptophanpyrrolase in der Leber.

Dennoch erschien es interessant, ein Steroid zu prüfen, das von den Androgenen abgeleitet ist, aber vorwiegend anabole und weniger androgene Wirkungen besitzt. Das abgebildete Me-

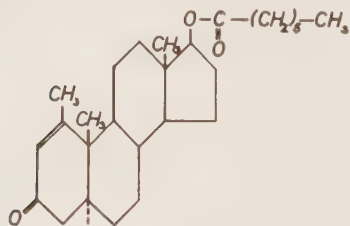
	intakt	kastriert	P
♀	$12,2 \pm 4,7$ (26)	$10,2 \pm 1,6$ (5)	$>0,05$
♂	$13,6 \pm 6,3$ (17)	$12,2 \pm 2,6$ (4)	$>0,05$

Tabelle 9: Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$ bei männlichen und weiblichen kastrierten Ratten 5 Stunden nach der i.p. Injektion von 1g/kg Dl-Tryptophan.

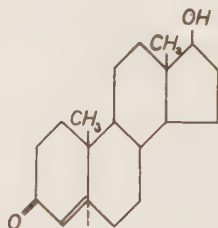
Körpergewicht der Ratten: 100 - 200 g

Alle Aktivitäten wurden ohne Hämatinzusatz zum Homogenat ermittelt. () Anzahl der untersuchten Tiere.

thenolon, das als Önanthat unter dem Warenzeichen Primobolan-Depot von der Firma Schering A.G., Berlin-West, in den Handel gebracht wird, ist ein solcher Stoff.



1-Methyl- Δ^1 -androsten-17 β -ol-3-on-17-önanthat = Methenolon-önanthat
= Primobolan-Depot^o



Δ^4 -androsten-17- β -ol-3-on = Testosteron

Kastrierte und intakte Ratten beiderlei Geschlechts wurden einmalig mit 175 mg/kg Primobolan-Depot i.m. behandelt. Die Kontrollen erhielten eine entsprechende Menge Sesamöl intra= muskulär. In verschiedenen Zeitabständen wurde das Gewicht der Tiere festgestellt (Abb.10 A-D). und nach 5-6 Wochen, am Ende des Versuches, die Tryptophanpyrrolaseaktivität in der Leber bestimmt.

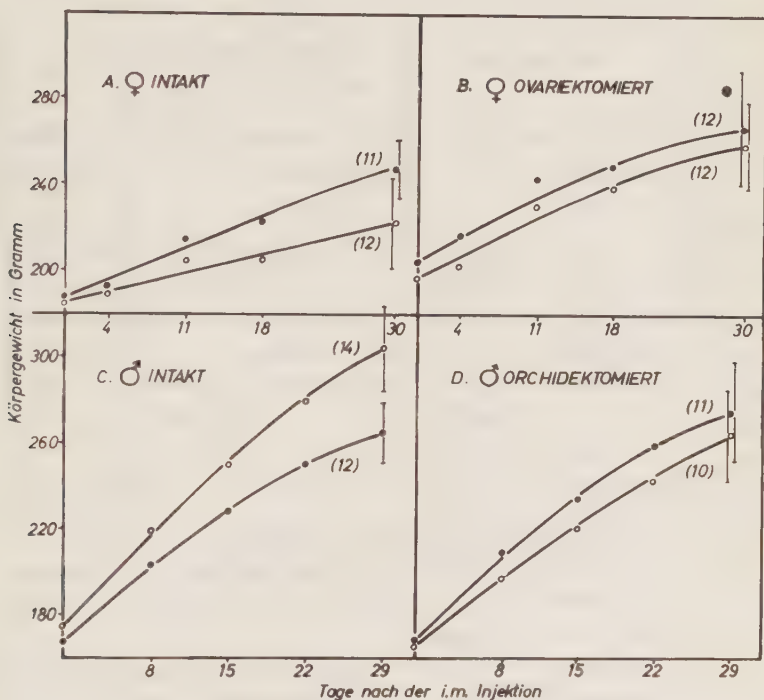


Abb.10: Gewichtsentwicklung intakter und kastrierter Ratten beiderlei Geschlechts nach der einmaligen i.m. Injektion von 175 mg/kg Methenolon-önanthate im Vergleich zu den mit Sesamöl i.m. behandelten Kontrollen.
 () Anzahl der untersuchten Tiere
 ● mit Methen.-ön. behandelte Tiere, ○ Kontrollen.
 Die Divergenz der Gewichtskurven bei intakten Männchen und Weibchen ist statistisch gesichert, $P < 0,01$.

In allen Gruppen ist die Tryptophanpyrrolaseaktivität der behandelten Tiere höher als bei den Kontrollen (Tab.10 + 11). Genau das gleiche Bild wie nach der einmaligen Injektion bieten die Tryptophanpyrrolaseaktivitäten männlicher intakter und kastrierter Ratten bei dreimaliger Behandlung mit Methenolon-önanthat 4 Monate nach der ersten intramuskulären Injektion (Tab.12).

	Kontrollen		175 mg/kg Methenolon-önanthat i.m.		P
	a)	b)	a)	b)	
intakt	1,47 $\pm$ 0,60 (11)		1,60 $\pm$ 0,38 (11)		>0,05
		2,51 $\pm$ 0,73 (11)		3,17 $\pm$ 0,78 (10)	<0,025
ovari=ekto=miert	0,91 $\pm$ 0,29 (15)		1,50 $\pm$ 0,48 (15)		<0,01
		1,42 $\pm$ 0,54 (11)		2,15 $\pm$ 0,62 (12)	<0,01

Tabelle 10: Tryptophanpyrrolaseaktivitäten in $\mu\text{mol/g/h}$ bei weiblichen intakten und ovariectomierten Ratten 5-6 Wochen nach der i.m. Injektion von 175 mg/kg Methenolon-önanthat.

a) ohne, b) mit Hämatinzusatz zum Homogenat gemessen. () Anzahl der untersuchten Tiere.

Die Zunahme des Körpergewichtes wird durch Methenolon-önanthat nicht in gleicher Richtung beeinflusst wie die Aktivität der Tryptophanpyrrolase. Bei intakten männlichen Ratten zum Beispiel bewirkt es eine Verzögerung des Wachstums, und bei kastrierten Tieren beiderlei Geschlechts ist die Gewichtskurve durch die verwendeten Dosen praktisch unverändert (Abb.10). Am deutlichsten zeichnet sich die Erhöhung der Tryptophanpyrrolaseaktivität durch Methenolon bei den ovariectomierten Weibchen ab (Tab.10), obwohl gerade hier an den Gewichtskur-

	Kontrollen		175 mg/kg Methenolon-önanthat i.m.	P
	a)	b)	a) b)	
intakt	1,96±0,97 (13)		2,27±0,61 (12)	> 0,05
		2,97±0,97 (13)	3,87±1,0 (12)	< 0,025
orchid=ekto=miert	1,51±0,42 (10)		2,08±0,54 (11)	< 0,01
		3,14±1,04 (10)	3,84±1,07 (11)	> 0,05

Tabelle 11: Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$ bei männlichen intakten und orchidektomierten Ratten 5-6 Wochen nach der i.m. Injektion von 175 mg/kg Methenolonönanthat.
a) ohne, b) mit Hämatinzusatz zu Homogenat gemessen. () Anzahl der untersuchten Tiere.

	Kontrollen		3 x Methenolon-önanthat i. m.	P
	a)	b)	a) b)	
intakt	1,95±0,71 (17)		2,45±0,54 (13)	> 0,05
		2,79±0,76 (17)	3,98±0,56 (13)	< 0,01
orchid=ekto=miert	1,69±0,42 (5)		2,56±0,89 (6)	< 0,025
		2,88±0,70 (5)	3,23±0,96 (6)	> 0,05

Tabelle 12: Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$ bei männlichen intakten und orchidektomierten Ratten 4 Monate nach folgender Methenolon-önanthat-Behandlung: 50 mg/kg am 1.Tag, 25 mg/Ratte am 24. und 25 mg/Ratte am 50. Tag

ven nicht der geringste Effekt zu sehen ist (Abb.10 B). Da= gegen ruft das injizierte Anabolicum nur bei den intakten weiblichen Tieren eine statistisch nachweisbare Stimulierung der Gewichtsentwicklung hervor (Abb.10 A).

f) Die Folgen der Thyreo-Parathyreoidektomie für die Induk= tion der Tryptophanpyrrolase.

L-Thyroxin fördert die Proteinbiosynthese in vitro, wenn Ratten damit vorbehandelt wurden oder das Hormon dem In-Vit= ro-System direkt zugesetzt wird (19). Weitere Untersuchungs= ergebnisse sprechen für eine Beeinflussung der Aminosäure= übertragung von der löslichen Ribonucleinsäure auf die Ribo= somen (20). Deshalb wurden die Folgen der Thyreoidektomie für die normale Tryptophanpyrrolaseaktivität von Ratten und die Vermehrung nach intraperitonealer Tryptophaninjektion 35 Tage nach der Operation festgestellt. Aus technischen Grün= den wurden bei diesen Tieren gleichzeitig die Epithelkörperchen entfernt. D

	intakt	thyreo-parathyreoid=
	a) b)	ektomiert a) b)
unbehandelt ♀ 100 - 200 g	1,28±0,43 (69) 2,13±0,67 (9)	1,48±0,58 (9) 2,73±0,59* (12)
5 Std. nach 1g/kg DL-Tr. i.p. ♀ 100 - 200 g	12,2±4,7 (26) 19,0±3,6 (19)	- 19,2±4,9 (4)

Tabelle:13: Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$ von thyreo-parathyreoidektomierten Ratten vor und 5 Stunden nach der i.p. Injektion von 1g/kg DL.Tryptophan. * $P < 0,025$ gegen= über intakten Ratten. a) ohne, b) mit Hämatinzusatz ermittelt. () Anzahl der untersuchten Tiere.

Die Apoenzymkonzentration in der Leber steigt nach der Thyreo-Parathyreoidektomie etwas an; denn mit Hämatin gemessen, ist die Aktivität bei den operierten Tieren höher als bei intacten Ratten. Die Induktion der Enzymsynthese durch DL-Tryptophan wird nicht beeinflusst (Tab.13).

g) Nahrungsentzug und Tryptophanpyrrolaseaktivität.

Aus den Ergebnissen der Tabelle 14 ist zu ersehen, daß bereits nach 24-stündigem Nahrungsentzug eine Verdoppelung der Tryptophanpyrrolaseaktivität auftritt. Am 5. Tag wurde die

Dauer des Hungers in Tagen	Geschlecht	Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$		Mittl. Anfangsgewicht der hung. Ratten	Mittlere Gewichtsabnahme d. hung. Ratt	
		Kontrollratten (Futter ad libitum)	hungernde Ratten		g	%
				g		
1	♂	1,28 $\pm$ 0,15 (6)	2,58 $\pm$ 0,58 (5)	212	15	7,0
2	♂	1,30 $\pm$ 0,21 (5)	3,54 $\pm$ 0,50 (7)	212	26	12,3
	♀	-	2,63 $\pm$ 0,56 (6)	176	17	10,3
3	♂	1,31 $\pm$ 0,26 (6)	3,63 $\pm$ 0,54 (6)	186	28	15,0
5	♀	1,14 $\pm$ 0,50 (8)	4,62 $\pm$ 1,02 (5)	159	36	22,6
7	♀	-	4,83 $\pm$ 1,39 (4)	155	36	23,2

Tabelle 14 : Tryptophanpyrrolaseaktivität und Gewichtsabnahme von hungernden Ratten.

Die hungernden und die Kontrollratten erhielten Trinkwasser ad libitum. Die Enzymaktivitäten wurden ohne Hämatinzusatz zum Homogenat ermittelt. () Anzahl der untersuchten Tiere.

3,5- bis 5-fache Aktivität gemessen. Die Enzymkonzentration steigt mit der Gewichtsabnahme an. Adrenalektomierte hungern=

de Ratten zeigen trotz Abnahme des Körpergewichtes keine Veränderung der Enzymaktivität (Tab.15). Die Induzierbarkeit der Tryptophanpyrrolase durch DL-Tryptophan ist nach 48-stündigem Hungern nicht beeinträchtigt. (Tab.16).

Dauer des Hungerns in Tagen	Geschlecht	Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$		Mittl. Anfangsgewicht der hung. Ratten.	Mittlere Gewichts=abnahme d. hung. Ratten.	
		Kontrollratten (Futter ad libitum)	hungernde Ratten		g	%
				g		
2	♀	0,96 $\pm$ 0,35 (11)	1,10 $\pm$ 0,26 (5)	167	20	12,0
3	♀		0,88 $\pm$ 0,15 (6)	156	17	10,9

Tabelle 15: Tryptophanpyrrolaseaktivität und Gewichtsabnahme von adrenaletomierten hungernden Ratten.

Die Kontrolltiere waren ebenfalls adrenaletomiert. Kontrollratten und hungernde Ratten erhielten Trinkwasser ad libitum. Die Enzymaktivitäten wurden ohne Hämatinzusatz zum Homogenat ermittelt.

Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$		Mittleres Anfangsgewicht in g	Mittlere Gewichts=abnahme	
Kontrollen	hungernde Ratten		g	%
12,2 $\pm$ 4,7 (26)	10,9 $\pm$ 1,9 (6)	176	17	9,7

Tabelle 16: Induktion der Tryptophanpyrrolase bei hungernden Ratten(2 Tage Nahrungsentzug). Kontrollen und hungernde Tiere wurden 5 Stunden nach 1 g/kg DL-Tryptophan i.p. untersucht. Die Enzymaktivitäten wurden ohne Hämatinzusatz zum Homogenat ermittelt. () Anzahl der untersuchten Tiere.

Diese Beobachtungen besagen, daß die innerhalb kurzer Zeit in hungernden Ratten auftretende Vermehrung der Tryptophan-pyrrolaseaktivität an die Anwesenheit der Nebennieren im Organismus gebunden ist. Steigerung der Enzymaktivität und Gewichtsabnahme laufen parallel. Es bleibt fraglich, ob die offenbar freigesetzten Glucocorticoide direkt oder über einen katabolen Mechanismus wirksam werden.

h) Elektronenmikroskopisch sichtbare Veränderungen in der Leberzelle nach der Induktion mit Cortison und Tryptophan.

Die induzierte Anreicherung der Arzneimittel oxydierenden Enzyme in den Lebermikrosomen geht mit morphologischen Veränderungen der Leberzelle einher, die Remmer und Merker elektronenmikroskopisch dargestellt haben (21). Ein bis zwei Tage nach der Applikation von 80mg/kg Luminal hat der Anstieg der Enzymaktivität mit einer Steigerung auf das Dreis- bis Vierfache sein Maximum erreicht. Zu dieser Zeit schießen im Cytoplasma als "smooth membranes" bezeichnete Doppelmembranen auf, während grobere, mit Bleihydroxyd kontrastierende Partikel, die als glycogenhaltige Speicher gedeutet werden, weitgehend verschwinden. Gleichzeitig finden sich zwischen den sogenannten "rough membranes" zahlreiche kleine körnchenartige Verdichtungen, die wie abgelöste Ribosomen aussehen. Die Ribosomen sind normalerweise an der Außenseite der "rough membranes" angeheftet und nur spärlich frei zwischen ihnen anzutreffen. Die Ribosomen sollen die Strukturen sein, an denen die Proteinbiosynthese stattfindet. "Rough" und "smooth membranes" ergeben zusammen beim Auftrennen der Zellbestandteile durch fraktioniertes Zentrifugieren des Organhomogenates die sogenannte Mikrosomenfraktion, die somit als Kunstprodukt gelten muß. Mit Hilfe der Gradiententrennung können die Mikrosomen jedoch weiter in spezifisch leichte und spezifisch schwere Partikel aufgeteilt werden. Dabei ergibt sich, daß die für den Abbau von zahlreichen Arzneimitteln verantwortlichen TPN-abhängigen Enzyme vorwiegend in den leichteren membranösen Gebilden vorkommen. Diese sollen in der Zelle den "smooth membranes" entsprechen.

Auf Grund der Beobachtungen von Remmer und Merker erscheint der Schluß gerechtfertigt, daß bei der von ihnen untersuchten induktiven Mehrbildung von Enzymprotein eine Strukturänderung in der Zelle auftritt. Deshalb wurde geprüft, ob auch bei der Induktion der Tryptophanpyrrolase ein Strukturwandel festzustellen ist. Gemeinsam mit Herrn Priv.-Doz. Dr. Merker von der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie des Anatomischen Institutes der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin wurde der Frage nachgegangen.

Tatsächlich fanden sich nach Cortison- und nach Tryptophaninjektion die gleichen Veränderungen (Abb.11-13) wie die von Remmer und Merker beschriebenen, obwohl die Zeit zwischen der Gabe des induzierenden Stoffes und der Leberentnahme bei den vorliegenden Untersuchungen viel kürzer war. Während Remmer und Merker 2 Tage gewartet haben, wurde die Leber hier bereits 5 Stunden nach der Injektion entnommen, weil zu dieser Zeit die Tryptophanpyrrolase schon stark angereichert ist. Die Effekte von Cortison und Tryptophan unterschieden sich nicht. Aus diesem Grunde wurde das gleiche Experiment mit adrenaletomierten Ratten wiederholt. Die Entfernung der Nebennieren führt zu keiner Strukturänderung (Abb.14). Durch Cortison werden die "smooth membranes" vermehrt, die Glycogenspeicher vermindert und zahlreiche freie Ribosomen zwischen den "rough membranes" sichtbar (Abb.15). Tryptophan dagegen löst an der Leber adrenaletomierter Ratten keine derartigen Erscheinungen aus (Abb.16), obwohl Tryptophan auch beim Fehlen der Nebennieren induzierend wirkt.

Die morphologischen Veränderungen der Zellstruktur während der Induktion beider Fermentsysteme sind also sehr ähnlich, wenn nicht identisch. Deshalb erschien es angezeigt zu prüfen, ob auch nach Tryptophaninjektion eine vermehrte Oxydation von Arzneimitteln stattfindet. Zu diesem Zweck wurde der Abbau von Hexobarbital im Leberhomogenat von Ratten bestimmt, die 5 Stunden vorher 1,5 g/kg DL-Tryptophan i.p. erhalten hatten. Die gefundene Erhöhung liegt innerhalb der Streuung und muß somit als zufällig betrachtet werden (Tab.17). Auf jeden Fall ist sie viel geringer als die von Remmer nach

Kontrollen	5 Stunden nach i.p. Injektion von 1,5 g/kg DL-Tryptophan
$2,09 \pm 0,74$ (3)	$2,44 \pm 0,64$ (4)

Tabelle 17: Abbau von Hexobarbital im Leberhomogenat von über 200 g schweren weiblichen Ratten vor und nach der Behandlung mit DL-Tryptophan. Die Werte geben die Menge von Hexobarbital in μmol an, die durch ein Gramm frisch entnommener Leber innerhalb einer Stunde oxydiert worden ist ($\mu\text{mol/g/h}$). () Anzahl der untersuchten Tiere.

Behandlung mit Phenobarbital-Na	Tryptophanpyrrolaseaktivität in $\mu\text{mol/g/h}$
unbehandelte Kontrollen	$2,03 \pm 0,88$ (71)
1 x 100 mg/kg i.p.	$2,20 \pm 0,43$ (8)
6 x 60 mg/kg i.p.	$2,70 \pm 0,72$ (8)
8 x 60 mg/kg i.p.	$2,40 \pm 0,60$ (8)

Tabelle 18: Tryptophanpyrrolaseaktivität der Leber von über 200 g schweren weiblichen Ratten nach der intraperitonealen Injektion von Phenobarbital-Natrium. Bei wiederholter Behandlung wurden die Einzeldosen an aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht. 5 Stunden nach der letzten Injektion wurde die Enzymaktivität bestimmt. () Anzahl der untersuchten Tiere.

Luminalbehandlung beschriebene Steigerung. Umgekehrt hat auch die Vorbehandlung mit Luminal keine Erhöhung der Tryptophanpyrrolaseaktivität zur Folge. Aus der Gleichartigkeit der

morphologischen Veränderungen kann also nicht auf gleiche funktionelle Veränderungen geschlossen werden.

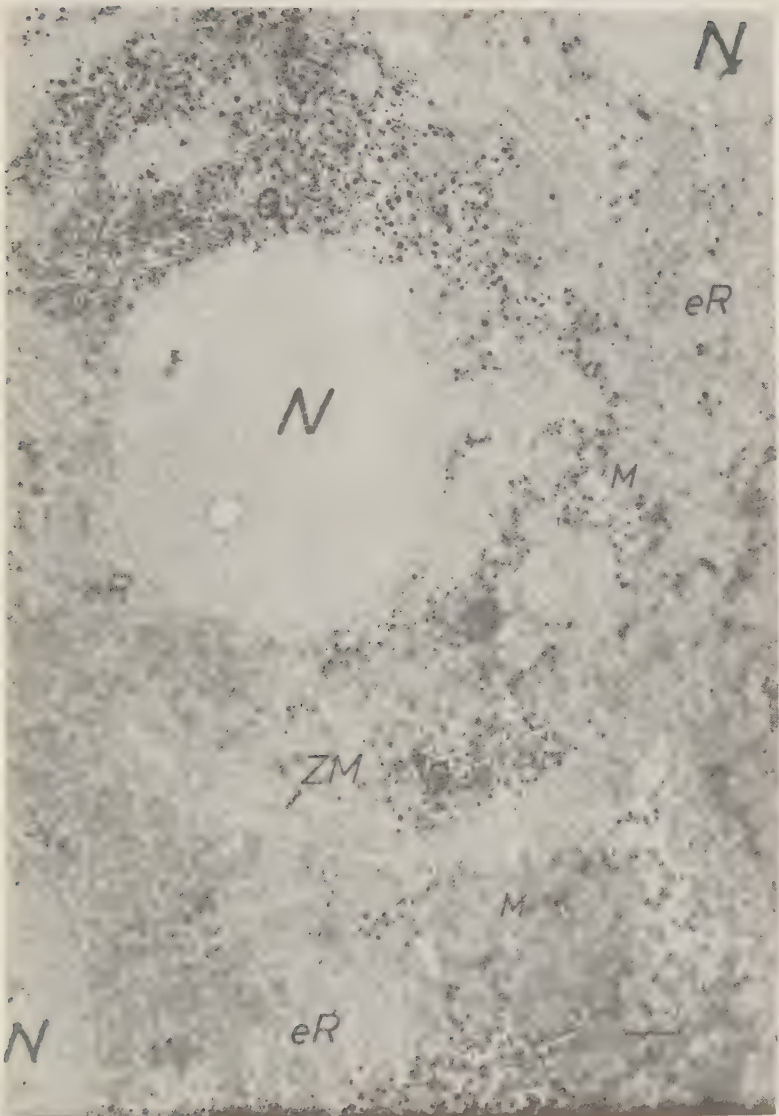


Abb.11: Übersichtsbild aus der Leber einer unbehandelten Ratte (Vergrößerung 1 : 10500): G = Glycogenpartikel, N = Nucleus, eR = endoplasmatisches Retikulum mit Ribosomenbesatz (= rough membranes) M = Mitochondrien, ZM = Zellmembran

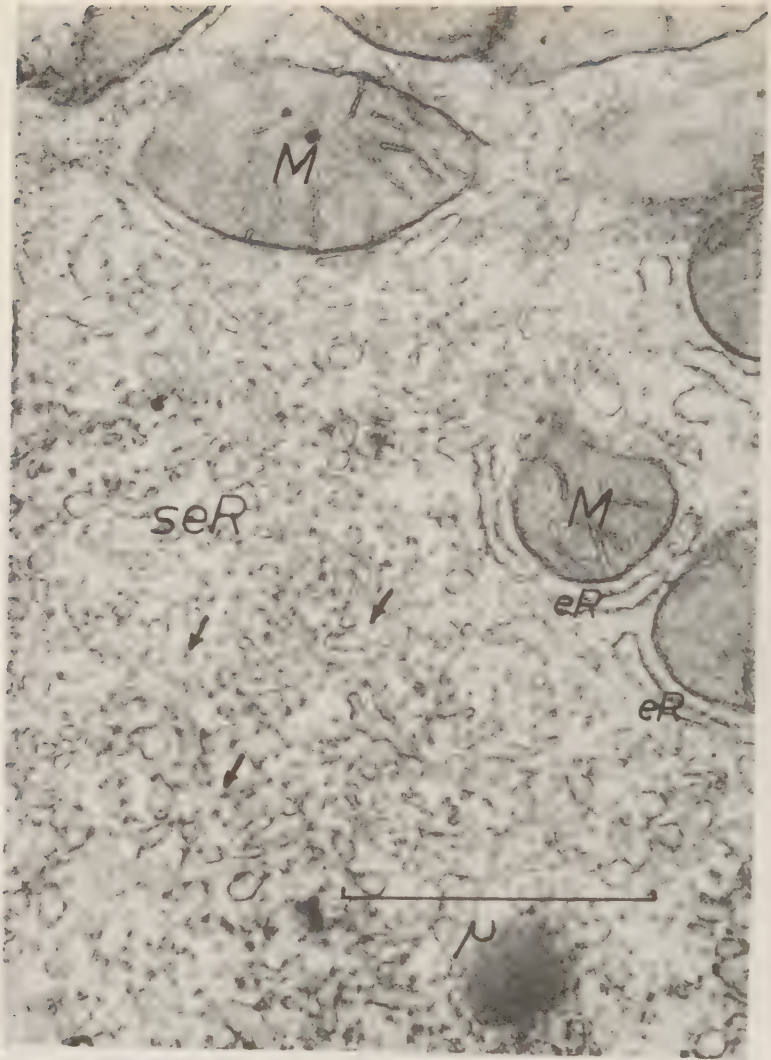


Abb.12: Teil einer Leberzelle von einer intakten Ratte, die 5 Stunden vorher mit 100 mg/kg Cortisonacetat i.p. behandelt worden ist (Vergrößerung 1 : 60000):
seR = Profile des glatten endoplasmatischen Reticulums (smooth membranes), eR = endoplasmatisches Reticulum mit Ribosomenbesatz (rough membranes),
M = Mitochondrien, ↓ = einzelne wenig elektronendichte Glycogengranula

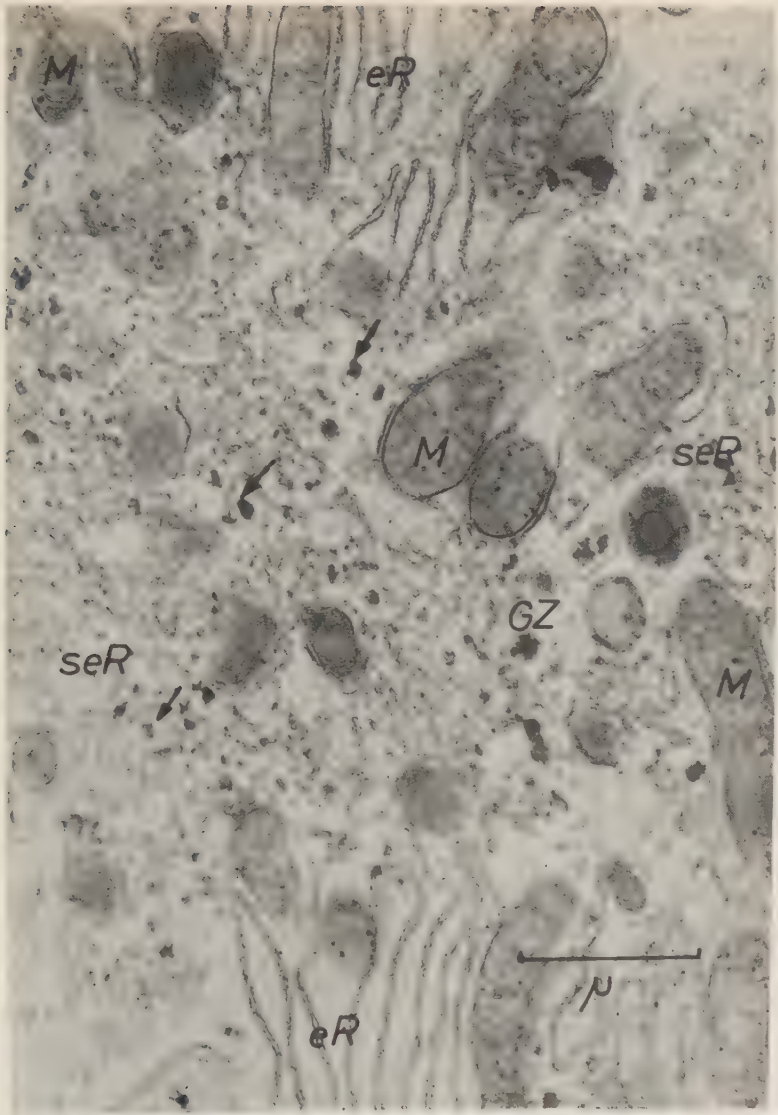


Abb.13: Teil einer Leberzelle von einer intakten Ratte, die 5 Stunden vorher mit 1,5 g/kg DL-Tryptophan i.p. behandelt worden ist (Vergrößerung 1 : 35000):
seR = glattes endoplasmatisches Reticulum (smooth membranes) , eR = endoplasmatisches Reticulum mit Ribosomenbesatz (rough membranes), GZ = Golgi-Zone,
↓ = einzelne Glycogengranula, M = Mitochondrien

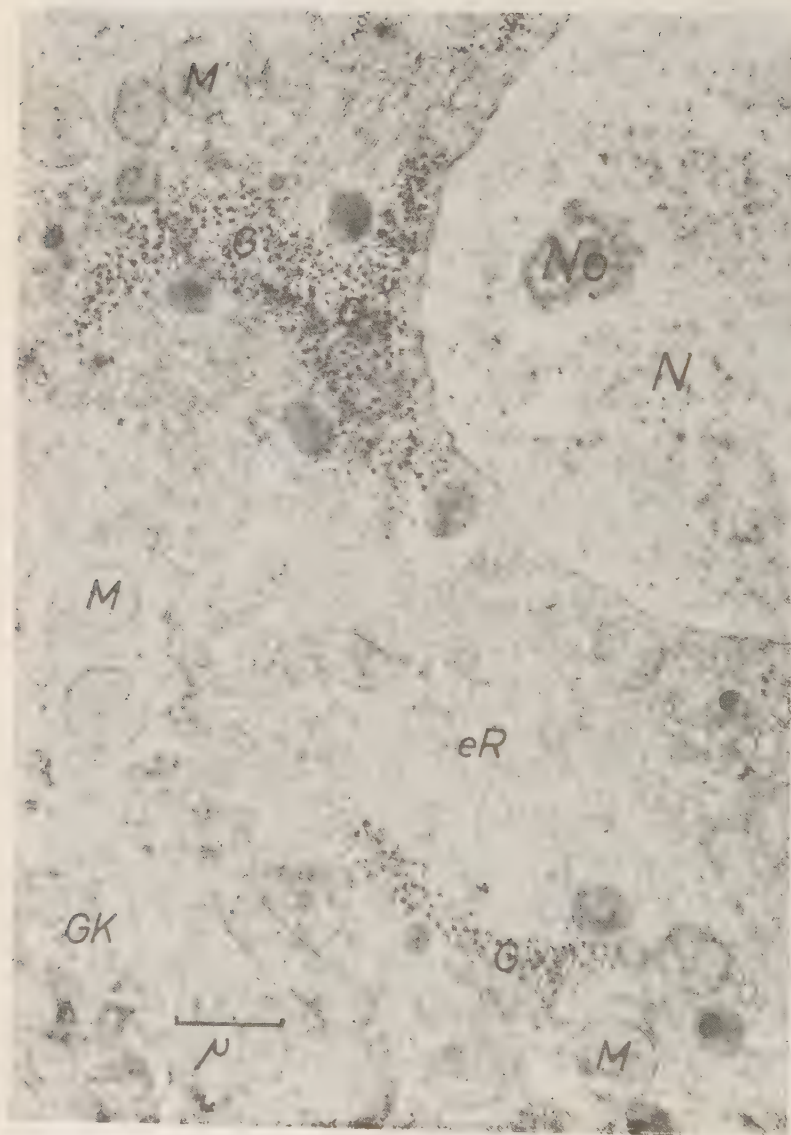


Abb.14: Ausschnitt aus einer Leberzelle von einer unbehandelten adrenalectomierten Ratte (Vergrößerung 1 : 21000): eR = endoplasmatisches Reticulum mit Ribosomenbesatz (rough membranes), N = Nucleus , No = Nucleolus, G = Glycogen , M = Mitochondrien , GK = Gallenkapillare

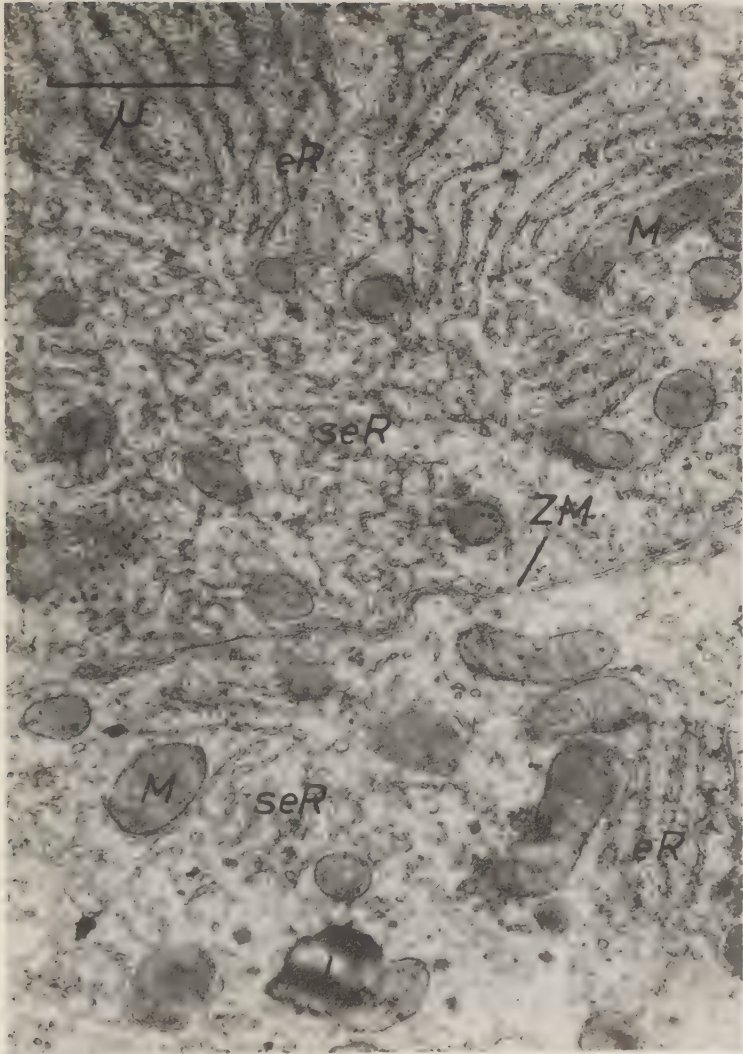


Abb.15: Teile von Leberzellen einer adrenalectomierten Ratte 5 Stunden nach der i.p.Injektion von 100 mg/kg Cortisonacetat (Vergrößerung 1 : 35 000): eR = typische ergastoplasmatische Doppellamellen mit aufsitzenden Ribosomen, seR = Profile des glatten endoplasmatischen Reticulums, M = Mitochondrien, L = Lipoidtropfen, ZM = Zellmembran



Abb.10: Ausschnitt aus einer Leberzelle von einer adrenal=ektomierten Ratte 5 Stunden nach der i.p. Injektion von 1,5 g/kg DL-Tryptophan (Vergröß. 1:35000): eR = endoplasmatisches Reticulum mit Ribosomenbe=satz (rough membranes), N = Nucleus, G = Glycogen, M = Mitochondrien.

Besprechung der Ergebnisse:

a) Untersuchungen in vitro.

Die Tryptophanpyrrolaseaktivität wird durch Ergänzung des Homogenates mit Cofaktor je nach dem Lebensalter der Ratten um 40 bis 150 % gesteigert. Nemeth und De La Haba fanden niemals mehr als 30 % Aktivitätszunahme durch Hämatinzusatz im nichtfraktionierten Leberhomogenat (22). Diese Autoren arbeiteten aber nur mit einem Viertel der von uns verwendeten Hämatinkonzentration, nämlich $0,5 \mu\text{mol/l}$, wie Feigelson und Greengard (12) im fraktionierten Cytoplasma. Bei eigenen Versuchen mit Leberhomogenat reichte diese Konzentration nicht aus. Greengard und Feigelson wiesen die Hämatinbindung durch Albumine im Zellsaft nach (11,23). Vielleicht sind diese oder andere Proteine, die mit der Tryptophanpyrrolase um das Hämatin konkurrieren, im Homogenat reichlicher als im isolierten Zellsaft vorhanden, so daß höhere Hämatinkonzentrationen zur vollständigen Aktivierung des Apoenzyms notwendig sind. Die Verhältnisse in Leberhomogenat sind auch deshalb mit denen im isolierten Zellsaft nicht vergleichbar, weil die anwesenden Mikrosomen in den ersten 20 Minuten der Inkubation noch Enzym aktivieren können und vielleicht außerdem eine Freisetzung partikelgebundenen Apoenzyms erfolgt (24).

Die Vorinkubation des Homogenates ohne Hämatin bei 38°C vermindert die Wirksamkeit später zugegebenen Hämatins bzw. hebt sie auf. Da der noch verbliebene Effekt jeweils sofort nach der Zugabe auftritt, wie aus Abbildung 2 zu ersehen ist, kann die sofortige Bindung des Hämatins an die Apotryptophanpyrrolase gefolgert werden. Die Ursache der Wirkungsverminderung ist deshalb in einer Veränderung des freien Apoenzyms zu suchen, die mit fortschreitender Inkubationsdauer immer mehr Moleküle erfaßt und die Bildung aktiven Holoenzym verhindert. Es kann bei der angewandten Versuchsmethodik nicht entschieden werden, ob die Veränderung in einem Abbau des Enzymproteins, einer Wandlung der Tertiärstruktur oder einer Blockierung des Enzymmoleküls durch einen Hemmstoff besteht.

Civen und Knox berichten über die Stabilisierung des Enzyms durch L-Tryptophan in vitro (25). Jedoch beziehen sich ihre Angaben auf die Erhaltung von Enzymaktivitäten, die ohne Ergänzung des Versuchsansatzes mit Cofaktor erhalten worden sind. Sie sagen also nichts darüber aus, ob das nicht erfaßte freie Apoenzym im Homogenat durch Tryptophan ebenfalls stabilisiert wird, so daß eine Zerstörung desselben während der Inkubation oder eine derartige Umwandlung, die eine Aktivierung durch Hämatin unmöglich macht, nach den vorliegenden Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden kann.

Eine Blockierung des Apoenzyms durch Proto- oder Mesoporphyrin wurde von Greengard und Feigelson in vitro demonstriert (11,23). Erhöhte Hämatinkonzentrationen verdrängen diese Substanzen aus ihrer Bindung mit dem Enzymprotein, da diese eine geringere Affinität zur Apotryptophanpyrrolase besitzen als der spezielle Cofaktor. Ein solcher Mechanismus ist unwahrscheinlich, da selbst sehr hohe Hämatinkonzentrationen, z.B. $10 \mu\text{mol/l}$, das Enzym nicht reaktivieren. Außerdem spricht das allmähliche Eintreten der Wirkungsverminderung dagegen. Andere Hemmstoffe, die nicht mit dem Cofaktor, sondern mit dem Substrat um den Platz an der Tryptophanpyrrolase wetteifern, kommen prinzipiell in Frage. Frieden, Westmark und Schor haben in vitro zahlreiche kompetitiv und nichtkompetitiv wirkende Inhibitoren entdeckt (26).

Der Effekt des zugesetzten Hämatins ist im Leberhomogenat von jungen Ratten stärker als in dem von alten Tieren. Ein Hämatinmangel bei jungen Ratten ist unwahrscheinlich, weil die Mikrosomen während der Inkubation nur einen Teil ihres Cofaktorgehaltes an den apoenzymhaltigen Zellsaft abgeben und nach dem Abzentrifugieren zur Aktivierung eines weiteren Enzympräparates verwendet werden können (12). Der Mechanismus der Abgabe und seine Kinetik sind bisher nicht bekannt, so daß über die Abhängigkeit dieses Prozesses vom Alter der Tiere nichts ausgesagt werden kann. Konzentrationsunterschiede der hämatinbindenden Proteine in der Leber können selbstverständlich einen Einfluß auf die Verfügbarkeit von Hämatin für die Apotryptophanpyrrolase bedingen. Es wäre

also möglich, daß die Leber junger Tiere einen höheren Gehalt an diesen Eiweißfraktionen aufweist als die alter Ratten.

Ob nach der Tötung der Ratten bzw. nach dem Homogenisieren der Leber noch eine wesentliche Verschiebung des Verhältnisses von Apo- zu Holoenzym erfolgt, wenn kein Hämatin zugegeben wird, ist nicht geklärt. Das allmähliche Anlaufen der Reaktion bis zur vollen Geschwindigkeit ist zum Teil dadurch bedingt, daß die optimale Reaktionstemperatur von 37°C in dem kalt angesetzten Homogenat erst erreicht werden muß.

Stellen die Differenzen zwischen den mit und ohne Hämatin gefundenen Werten bei Ratten verschiedenen Alters die in vivo vorliegenden Verhältnisse dar oder sind diesen wenigstens proportional, so können sie unter dem Einfluß verschiedener Tryptophankonzentrationen in Lebern junger und alter Tiere zustande gekommen sein. Tryptophan verhindert die Dissoziation des Holoenzym (23) und sorgt damit für eine Verminderung der Apoenzymkonzentration im Zellsaft. Nach der von Feigelson, Feigelson und Greengard geschützten Hypothese (27) ist dies aber zugleich die Ursache für eine Vermehrung der gesamten Enzymkonzentration in der Leber. Somit bedeutet die insgesamt höhere Enzymaktivität bei älteren Ratten und die damit verbundene weitgehende Sättigung mit Cofaktor eine höhere Tryptophankonzentration in der Leber dieser Tiere. Dies entspricht der Auffassung, daß mit der Nahrung zugeführte Aminosäuren im Gegensatz zu jungen Tieren bei alten nicht so rasch verbraucht werden, weil Proteinsynthese und -abbau sich hier etwa ausgleichen. Es bestätigt zugleich den von Townsend und Sourkes nachgewiesenen Einfluß der mit der Nahrung zugeführten Tryptophanmenge auf die Aktivität der Tryptophanpyrrolase der Leber (28).

b) Untersuchungen in vivo.

Am Beispiel der Tryptophanpyrrolase ist zu erkennen, daß die Enzymkonzentration in der Zelle nicht konstant ist, sondern in weiten Grenzen schwanken kann. Dabei sind die durch endogene

Faktoren bedingten Veränderungen klein gegenüber den Variationen, die durch äußere Einwirkungen ausgelöst werden. Mit zunehmendem Alter steigt die Enzymaktivität etwa bis zur Verdoppelung an. Auch die rassebedingten Unterschiede gehören dieser Größenordnung an. Ähnlich wird es sich wohl auch bei anderen konstitutionellen Merkmalen verhalten, die allerdings in dieser Arbeit nicht näher untersucht wurden. Die Schlussfolgerung ist nur deshalb gerechtfertigt, weil darüber hinausgehende Abweichungen bei den sehr zahlreichen Untersuchungen an den unter einheitlichen Bedingungen gehaltenen Tieren nicht aufgetreten sind.

Dagegen können Milieuänderungen oder pharmakologische Einwirkungen einen sehr viel stärkeren Einfluß ausüben. Die mit jeder Art von schädlichen Einflüssen, deren unspezifische Folgen Selye als ein besonderes mit Stress bezeichnetes Syndrom beschrieben hat, führen zu einer drei- bis vierfachen Steigerung der Tryptophanpyrrolase in der Leber. Maikel, Westermann und Brodie haben diesen Effekt durch Kälteeinwirkung erzielt (29). Das gleiche tritt, wie vorstehend demonstriert, durch Nahrungsentzug ein. Je länger die Tiere hungrig müssen, desto mehr Tryptophanpyrrolase enthält die Leber, obwohl ihr Körpergewicht erheblich abnimmt und Eiweiß abgebaut wird. Durch vorherige Entfernung der Nebennieren wird diese Art der Induktion völlig unterdrückt. Sie kommt also höchstwahrscheinlich unter Vermittlung der Nebennieren zustande. Man darf wohl eine Ausschüttung von Glucocorticoiden aus der Nebennierenrinde dafür verantwortlich machen. Schon daraus geht hervor, daß die Nebennierenrindensteroidoide an der Regulation der Enzymkonzentration in der Zelle beteiligt sind. So erklärt sich auch die Verminderung der Enzymaktivität nach der Adrenalektomie und die Steigerung nach parenteraler Verabreichung von Cortison, die proportional der Dosis zunimmt.

Gegen diese Deutung könnte die Höhe der notwendigen Cortisondosen geltend gemacht werden, die die Mengen weit überschreiten, die von den Nebennieren produziert und abgesondert werden können. Hydrocortison übt aber in siebenfach geringerer Dosierung als Cortison den gleichen Effekt auf die Tryp-

tophanpyrrolaseaktivität der Ratte aus (30). Dieses Glucocorticoid wird zwar von der Rattennebenniere nicht gebildet, jedoch ist die Wirksamkeit des Corticosterons, das bei der Ratte vorwiegend zu finden ist, im Hinblick auf die Vermehrung der Tryptophanpyrrolaseaktivität noch nicht getestet worden. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß aus dem letzteren wirksamere Stoffwechselprodukte entstehen.

Die einmalige Applikation einer hohen Glucocorticoiddosis kann ohnehin nicht mit den natürlichen Verhältnissen gleichgesetzt werden, denn die physiologische Abgabe ins Blut erfolgt kontinuierlich. Offensichtlich spielt für den Effekt auf die Enzymkonzentration nicht nur die Erhöhung des Cortisongehaltes eine Rolle, sondern auch die Zeit, während der die erhöhte Cortisonkonzentration aufrecht erhalten wird. Die höheren Dosen wirken nicht stärker, sondern länger. Die Enzymmenge wurde in den hier durchgeführten Versuchen auf das Zehnfache der Norm gesteigert.

Noch stärkere Anreicherungen der Tryptophanpyrrolaseaktivität sind durch die Injektion des Substrates zu erzielen. Die erforderlichen Dosen sind sehr hoch und wirken teilweise bereits toxisch. Diese Form der Induktion muß sicher als Anpassungsvorgang angesehen werden, der auf höchste Anforderungen mit extremen Steigerungen der Enzymaktivität antwortet. Tiere, die innerhalb von 24 Stunden wiederholt hohe Dosen von DL-Tryptophan erhielten und infolgedessen schwer geschädigt da-niederlagen, hatten dennoch in der Leber ca. vierzigmal so-viel Tryptophanpyrrolase wie vor der Behandlung. Offenbar gehört die Substratkonzentration in der Zelle zu dem Regulationssystem, das für die Höhe der Enzymkonzentration verantwortlich ist. Diese Auffassung steht im Einklang mit den bereits diskutierten Befunden an intakten Tieren verschiedenen Alters.

Bei den hohen Dosen, die zur Induktion parenteral zugeführt wurden, muß an eine Mitwirkung von Nebennierenrindensteroiden gedacht werden, die infolge des mit der Applikation verbundenen Stress ausgeschüttet werden. Die elektronenmikroskopische

schen Aufnahmen der Leberzellen von intakten und adrenalektomierten Ratten nach Cortison- und Tryptophanbehandlung bestätigen das. Die Toxizität des Tryptophans nimmt nach der Adrenalektomie zu, der Effekt der höchsten Dosen auf die Tryptophanpyrrolaseaktivität wird um die Hälfte vermindert. Die Wirkungsverminderung bei adrenalektomierten Ratten ist nach hohen Dosen stärker, so daß in dem untersuchten Bereich auch keine Dosis-Wirkungs-Beziehung mehr festzustellen war. Unter der Voraussetzung einer kontinuierlichen, aber erhöhten Abgabe der Nebennierenrindensteroiden kann dies erklärt werden: Höhere Tryptophandosen wirken länger, halten die Stress-Bedingungen über längere Zeit aufrecht und sorgen damit für eine anhaltende Erhöhung der Glucocorticoidkonzentration. Die Dauer der Aufrechterhaltung einer hohen Steroidkonzentration ist also für das Ausmaß der Enzymanreicherung wesentlich. 1 g/kg DL-Tryptophan würde demnach etwa ausreichen, um die Glucocorticoidinkretion bei der Ratte über 5 Stunden soweit aufrecht zu erhalten, daß eine maximale Anreicherung der Tryptophanpyrrolase erfolgen kann. 50 mg/kg Cortisonacetat, zusätzlich gegeben, vermögen die Wirkung dieser Tryptophandosis beim intakten Tier nicht zu steigern. Dagegen addieren sich die Effekte bei der adrenalektomierten Ratte. In Verbindung mit 0,5 g/kg DL-Tryptophan bewirken 50 mg/kg Cortisonacetat eine erhebliche Steigerung der Tryptophanwirkung innerhalb von 5 Stunden, weil hier die Nebennierenrindentätigkeit nicht wesentlich erhöht wird oder die Stimulierung vorzeitig abklingt, was aus dem Vergleich der Wirkungen dieser Tryptophandosis bei intakten und adrenalektomierten Ratten hervorgeht. 5 mg/kg Cortisonacetat steigern auch die Wirkung dieser niedrigen Tryptophandosis beim intakten Tier nicht, wogegen wiederum eine Addition der Wirkungen beim adrenalektomierten Tier beobachtet werden kann. Vielleicht wird diese Dosis bereits weitgehend abgebaut bzw. ausgeschieden, bevor die stimulierende Wirkung des Tryptophans auf die Nebennierenrinde ertlischt. Die Tatsache, daß bei adrenalektomierten Ratten mit Cortison die gleichen Enzymaktivitäten wie mit Tryptophan hervorgerufen werden können, während der Cortisoneffekt gegenüber dem Tryptophaneffekt beim intakten Tier weit zurückbleibt, spricht ebenfalls für eine Mitwirkung von Neben-

rensteroiden nach Tryptophanverabreichung. Der Tryptophanefekt ist auch in hypophysektomierten Tieren stark abgeschwächt (31,32).

Tryptophan wirkt wahrscheinlich in adrenaletomierten Tieren nicht nur wegen der fehlenden Glucocorticoidausschüttung schwächer, denn auch der Effekt von Cortison ist in diesen Tieren erheblich vermindert, was Knox und Auerbach bereits gefunden haben (33). Vielleicht ist das Regulationssystem beim nebennierenlosen Tier weniger empfindlich für pharmakologische Eingriffe. Es muß angenommen werden, daß die Nebennieren auf zwei Wegen die Regulation der Enzymkonzentration beeinflussen, über eine Glucocorticoidausschüttung und über einen zweiten Mechanismus, der von diesen unabhängig ist. Eventuell steht der zweite Faktor mit der Funktion des Nebennierenmarkes in Verbindung. Weiterhin kann an eine Beeinträchtigung der Resorption von Cortison und Tryptophan als Ursache für die gefundene Wirkungsverminderung bei adrenaletomierten Ratten gedacht werden.

Über den Einfluß von Hypophysenhormonen liegen bisher keine direkten Beobachtungen vor. Die mit ACTH (31,32) und Wachstumshormon (34) bzw. in Verbindung mit Hypophysektomie (32,35) durchgeführten Untersuchungen wurden alle an sonst intakten Tieren durchgeführt, so daß die beobachteten Effekte über die Nebennieren zustande gekommen sein können. Über die Wirkung der Hypophysenhormone wäre eine Beeinflussung möglich, denn mit der Entfernung der Nebennieren fällt für die Absonderung der Vorderlappenhormone eine Hemmung weg, die zwar vorwiegend das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) betrifft, sich jedoch auch auf die anderen Hormone in gewissem Umfang auswirkt. Ob ACTH selbst die Bildung der Tryptophanpyrrolase verzögert, bleibt noch zu prüfen.

Die Ovariectomie hat einen deutlichen Einfluß auf die Enzymkonzentration in der Leber. Nach Orchidektomie ist eine Verminderung nur bei den älteren Männchen nachweisbar, wenn ohne Hämatinzusatz gemessen wird, so daß bei diesen ein Mangel an verfügbarem Cofaktor angenommen werden kann. Die durch Tryptophan

tophan ausgelöste Induktion war bei den kastrierten Tieren beider Geschlechter genauso stark wie bei intakten .

Das dem Testosteron verwandte Anabolicum Methenolon, das als Önanthat über Wochen anhaltende Depotwirkungen hervorruft (36), steigerte im Laufe von 6 Wochen nach einmaliger intramuskulärer Injektion die Enzymaktivität bei intakten und kastrierten Tieren männlichen und weiblichen Geschlechts. Das Körpergewicht der intakten Weibchen nahm um ca. 20 % mehr als bei den Kontrollen zu, die Steigerung der Tryptophanpyrrolaseaktivität betrug ca. 25 %. Ovariectomierte Ratten nahmen unter der Behandlung nicht schneller als die operierten Kontrollen zu, aber die Enzymkonzentration war um 50-65 % höher. Intakte Männchen zeigten nach Methenolon ca. 15 % Verzögerung der Gewichtszunahme, dagegen betrug die Enzymaktivität rund 30 % mehr. Nach der Orchidektomie bewirkte das Anabolicum weder eine Verzögerung noch eine Beschleunigung der Gewichtsentwicklung, aber eine 25-30 %ige Zunahme der Tryptophanpyrrolase. Methenolon beschleunigt also nicht generell die Proteinbildung. Jöchle und Langecker fanden etwa 3 Wochen nach der intramuskulären Injektion von 10 mg Methenolon-Önanthat bei Mäusen eine starke Vermehrung der β -Glucuronidase-Aktivität in der Niere, die in keinem Verhältnis zu der Wirkung auf das Wachstum der Tiere stand (36). Vermeulen und Demeulenaere berichteten über eine Verminderung der Serumcholinesterase beim Menschen nach der Behandlung mit anabolen Steroiden (37). Auf welche Weise diese Wirkungen zustande kommen ist gegenwärtig nicht zu entscheiden. Sie können von dem Steroid selbst direkt ausgelöst oder auf indirektem Wege über ein Stoffwechselprodukt oder durch die Freisetzung eines anderen Steroides hervorgerufen werden.

Aus den Experimenten an thyreo-parathyreoidektomierten Ratten kann geschlossen werden, daß die Schilddrüse höchstens einen geringen Einfluß auf die Fermentkonzentration in der Leber ausübt. Nach der Entfernung der Drüse steigt die Aktivität etwas an. Daraus geht zumindest hervor, daß keine Verminderung der Synthese erfolgt. Andere Autoren fanden keinen Effekt nach der Thyreoidektomie (32) bzw. nach der Behand-

lung mit Trijodthyronin (38). Die induzierende Wirkung von DL-Tryptophan bleibt nach der Thyreo-Parathyreoidektomie voll erhalten.

Zum Schluß ergibt sich die Frage, ob die Experimente zur Klärung des Mechanismus beitragen können, über den die Enzymanreicherung zustande kommt. Wird die Synthese beschleunigt, die Freisetzung vorgebildeten Enzyms gefördert oder der Abbau verzögert ?! Cortison, das generell katabol wirkt, könnte infolge eines verstärkten Abbaus von Eiweiß zur Erhöhung der Tryptophankonzentration in der Zelle führen und insofern das gleiche Ergebnis haben wie eine Induktion mit Tryptophan. Die von Civen und Knox bei adrenaletomierten Ratten gefundene Addition der Wirkungen von Tryptophan und Cortison (39), die durch eigene Ergebnisse bestätigt wird, kann in dieser Richtung gedeutet werden. Allerdings ist nach der alleinigen Cortisonbehandlung vorwiegend das freie Apoenzym vermehrt (27), während nach der Tryptophaninduktion mit ausreichend hohen Dosen fast nur das aktive Holoenzym vorliegt, was aus der fehlenden Aktivitätssteigerung durch Hämatin bzw. Mikrosomen in vitro hervorgeht. Infolge dieser und anderer Befunde (27,39) kann angenommen werden, daß die beiden Stoffe auf verschiedene Weise zur Enzymanreicherung führen. Über den Wirkungsmechanismus des Cortisons ist genau wie bei anderen Steroidhormonen nichts bekannt. Eine gesteigerte Enzymsynthese bei gleichbleibender oder nur unwesentlich beschleunigter Abbaugeschwindigkeit erscheint möglich.

Als Ursache für die Anreicherung durch Tryptophan ist der stabilisierende Effekt des Tryptophans auf die Tryptophanpyrrolase, der in vitro nachgewiesen wurde (25), diskutiert worden (40,41). Die Reaktion zwischen Tryptophan und Enzym könnte auf zweierlei Wegen zur Anreicherung führen. Erstens wird der Abbau infolge der größeren Stabilität des Substrat-Enzym-Komplexes vermindert, zweitens wird durch die Komplexbildung freies Apoenzym gebunden und damit das Gleichgewicht zwischen dem in Lösung befindlichen und dem am Bildungsort haftenden verschoben. Dadurch würde die Freigabe vom Bildungsort erleichtert, was zur beschleunigten Enzymsynthese

führen kann. Diese Hypothese stammt im wesentlichen von der Arbeitsgruppe um Feigelson und Greengard (27), die sie durch Experimente in vitro und in vivo stützten. Sie ist mit den vorliegenden Ergebnissen gut vereinbar. Durch Untersuchungen mit Hemmstoffen der Eiweißsynthese (22,42,43,44,45), Beobachtungen über den Einbau radioaktiver Aminosäuren (46,47,48) und mit einer immunochemischen Methode (49) sind Anhaltspunkte für eine vermehrte Proteinbiosynthese während der Tryptophaneinwirkung gewonnen worden. Dagegen wird der Ribonucleinsäureumsatz in der Leberzelle nach Messungen mit P^{32} erst 10 Stunden, nachdem die Tryptophanpyrrolase ihr Aktivitätsmaximum erreicht hat, erhöht (50), was mit einer gesteigerten Enzymsynthese nur schwer vereinbar ist. Nach den Befunden von Civen und Knox ist außerdem die Tryptophankonzentration in der Leberzelle zur Zeit der höchsten Enzymaktivität bereits zur Norm abgesunken (39). Das kann als Argument gegen die geschilderte Hypothese verwendet werden. Andererseits zeigen die Zeitstudien von Lee (51) und die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse, daß die Steigerung der Enzymaktivität davon abhängt, wie lange maximale Tryptophankonzentrationen im Organismus aufrecht erhalten werden.

Elektronenmikroskopisch wurde während der Induktion eine Vermehrung bestimmter Zellorganellen, nämlich der "smooth membranes", nachgewiesen. Gleichzeitig nahmen die elektronenoptisch sichtbaren Glycogenpartikel ab. Die gleichen Veränderungen ergaben sich bei Untersuchungen von Remmer und Merker nach wiederholter Behandlung von Ratten mit Luminal. Die so vorbehandelten Ratten wiesen gleichzeitig eine Vermehrung der TPN-abhängigen oxydierenden Fermente in der Leber auf (21). Obwohl mit dem Elektronenmikroskop zwischen den Leberzellen der mit Tryptophan und der mit Luminal behandelten Tiere kein Unterschied feststellbar ist, sind ihre biochemischen Leistungen nicht identisch: Die tryptophanbehandelten enthalten viel Tryptophanpyrrolase aber nicht mehr Evipan oxydierendes Ferment als normale Tiere, und bei Luminalvorbehandelten Ratten ist die Tryptophanpyrrolase nicht wesentlich vermehrt. Die Strukturänderungen im Inneren der Zellen sind bei den vorliegenden Untersuchungen wahrscheinlich durch Cortison be-

dingt, denn sie fehlten bei adrenalectomierten Tieren, deren Lebern infolge Vorbehandlung mit Tryptophan eine erhöhte Tryptophanpyrrolasemenge enthielten. Wurde die Induktion bei diesen nebennierenlosen Ratten dagegen mit Cortison hervorgerufen, trat auch bei ihnen die Strukturveränderung auf. Daher ist es zweifelhaft, daß das Aufschießen der "smooth membranes" kausal mit der vermehrten Enzymsynthese zusammenhängt.

Zusammenfassung:

Dem Leberhomogenat zugesetztes Hämatin erhöht die Aktivität der Tryptophanpyrrolase bei alten Ratten um 40 %, bei jungen Tieren um 150 %. $2 \mu\text{mol/g/h}$ sind bei unbehandelten und bei tryptophanbehandelten Tieren zur Aktivierung des gesamten Apoenzyms ausreichend. Der Cofaktor muß nach Möglichkeit vor dem Homogenisieren zugesetzt werden, da der Effekt bei späterer Zugabe nachläßt.

Die Enzymaktivität nimmt mit fortschreitendem Alter bei beiden Geschlechtern zu. Sie ist bei Männchen und Weibchen gleich hoch. Obwohl Rassenunterschiede in den Ergebnissen nicht eindeutig zum Ausdruck kommen, muß insbesondere ein Einfluß der genetisch bedingten Wachstumsgeschwindigkeit verschiedener Rassen angenommen werden.

Ovariectomie und Adrenalectomie vermindern die Tryptophanpyrrolasekonzentration in der Leber, Orchidektomie und Thyreo-Parathyreoidektomie beeinflussen sie nicht oder nur unwesentlich. 175 mg/kg Methenolonönanthrat i.m. erhöhen die Tryptophanpyrrolaseaktivität im Laufe von 6 Wochen bei intakten und kastrierten Ratten männlichen und weiblichen Geschlechts, während nur bei intakten Weibchen nach der Behandlung eine beschleunigte Gewichtszunahme beobachtet wird.

Alter, Kastration und Thyreo-Parathyreoidektomie verändern das Ausmaß der Induktion nach DL-Tryptophaninjektion nicht. Dagegen ist die Wirkung von DL-Tryptophan und von Cortisonacetat bei adrenalectomierten Tieren erheblich abgeschwächt. Während Cortisonacetat bei intakten Ratten die Tryptophanwirkung nicht vermehrt, wird bei adrenalectomierten Tieren eine Addition der Effekte nachgewiesen. Für die Höhe der induzierten Enzymaktivität ist die Zeit, in der hohe Tryptophan- bzw. Cortisonkonzentrationen im Organismus aufrecht erhalten werden, entscheidend. Die Größe der einmaligen Dosis hat nur Bedeutung, weil höhere Dosen länger wirken. Bei den mit Tryptophan durchgeführten Versuchen wurde nach 5 Stunden die zehnfache, nach 8 Stunden die zwanzigfache und nach 22,5

Stunden die vierzigfache Enzymaktivität von unbehandelten Ratten gemessen. Mit Cortisonacetat konnte bei entsprechender Dosierung die Tryptophanpyrrolase innerhalb von 5 Stunden sechs- bis siebenfach und innerhalb von 8 Stunden zehnfach vermehrt werden.

Die einmalige und wiederholte Behandlung von Ratten mit Luminal-Natrium verändert die Tryptophanpyrrolaseaktivität nicht, und durch die intraperitoneale Injektion von DL-Tryptophan werden die TPN-abhängigen oxydierenden Enzyme der Leber nicht vermehrt. Dagegen kann elektronenmikroskopisch ein Aufschießen der "smooth membranes", eine Zunahme "freier Ribosomen" zwischen den "rough membranes" und ein Schwund der "Glycogenpartikel" in der Leber cortison- und tryptophanbehandelter Ratten nachgewiesen werden. Bei adrenaletomierten Tieren treten diese Strukturänderungen nur nach der Cortisonbehandlung auf, nicht jedoch nach Tryptophanbehandlung.

Literaturverzeichnis:

1. Remmer, H.: Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin, 69. Kongreß 1963, Bergmann Verlag München, S.99
2. Jacob, F. u. Monod, J.: J. molec. Biol. 3, 318 (1961)
3. Pardee, A.B., Jacob, F. u. Monod, J.: J. molec. Biol. 1, 165 (1957)
4. Knox, W.E.: Brit. J. Exptl. Pathol. 32, 462 (1951)
5. Knox, W.E. u. Mehler, A.H.: J. biol. Chem. 187, 419 (1950)
6. Knox, W.E.: Methods in Enzymology, Vol. II, Acad. Press Inc., New York, S.242 (1955)
7. Stanier, R.Y. u. Tsuchida, M.: J. Bact. 58, 45 (1949)
Stanier, R.Y.: J. Bact. 55, 477 (1948)
Tatum, E.L. u. Haagen-Smit, A.J.: J. biol. Chem. 140, 575 (1941)
Beadle, G.W., Mitchell, H.K. u. Nye, J.F.: Proc. Nat. Acad. Sc. 33, 155 (1947)
zitiert nach Knox, W.E. u. Mehler, A.H.:
J. biol. Chem. 187, 419 (1950)
8. Butenandt, A., Weidel, W., Weichert, R. u.
von Derjugin, W.: Z. physiol. Chem. 279, 27 (1943)
Kikkawa, H.: Genetics 26, 600 (1941)
zitiert nach Knox, W.E. u. Mehler, A.H.:
J. biol. Chem. 187, 419 (1950)
9. Tanaka, T. u. Knox, W.E.: J. biol. Chem. 234, 1162 (1959)
10. Hayashi, O., Rothberg, S., Mehler, A.H. u. Saito, Y.:
J. biol. Chem. 229, 889 (1957)
11. Greengard, O. u. Feigelson, P.: J. biol. Chem. 237, 1903 (1962)
12. Feigelson, P. u. Greengard, O.: J. biol. Chem. 236, 153 (1961)
13. Greengard, O. u. Feigelson, P.: J. biol. Chem. 236, 158 (1961)
14. Greengard, O. u. Feigelson, P.: Biochim. Biophys. Acta 39, 191 (1960)

15. Chytil, F.: Collection Czechoslov. Chem. Commun.
27, 1487 (1962)
16. Chytil, F.: Biochim. Biophys. Acta 48, 217 (1961)
17. Knox, W.E. u. Mehler, A.H.: Science 113, 237 (1951)
18. Brodie, B.B., Burns, J.J., Mark, L.C., Lief, P.A.,
Bernstein, E. u. Papper, E.M.: J. Pharmacol. a. Exper.
Ther. 109, 26 (1953)
19. Sokoloff, L. u. Kaufman, S.: J. biol. Chem. 236, 795 (1961)
20. Sokoloff, L., Kaufman, S., Campbell, P.L., Francis, C.M.
u. Gelboin, H.V.: J. biol. Chem. 238, 1432 (1963)
21. Remmer, H. u. Merker, H.J.: Klin. Wschr. 41, 276 (1963)
22. Nemeth, A.M. u. de la Haba, G.: J. biol. Chem. 237,
1190 (1962)
23. Feigelson, P. u. Greengard, O.: J. biol. Chem. 237,
1908 (1962)
24. Pitot, H.C. u. Cho, Y.S.: Biochim. Biophys. Acta 50
197 (1961)
25. Civen, M. u. Knox, W.E.: J. biol. Chem. 235, 1716 (1960)
26. Frieden, E., Westmark, G.W. u. Schor, J.M.: Arch. Bio=
chem. Biophys. 92, 176 (1961)
27. Feigelson, P., Feigelson, M. u. Greengard, O.: Rec. Progr.
Horm. Res., Vol.18 (1962), Acad. Press, Inc., New York,
S.491
28. Townsend, E.E. u. Sourkes, T.L.: Canad. J. Biochem. Physiol.
36, 659 (1958)
29. Maikel, K.P., Westermann, E.O. u. Brodie, B.B.: J. Pharma=
col. a. Exper. Ther. 134, 167 (1961)
30. Thomson, J.F. u. Mikuta, E.T.: Endocrinology 55, 232 (1954)
31. Geschwind, J. u. Li, C.H.: Nature 172, 732, (1953)
32. Thomson, J.F. u. Mikuta, E.T.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med.
85, 29 (1954)
33. Knox, W.E. u. Auerbach, V.H.: J. biol. Chem. 214,
307, 1955
34. Rivlin, R.S. u. Knox, W.E.: Amer. J. Physiol. 197,
65 (1959)

35. McCann, S.M., Matsumura, Y., Dimick, M.K., Pencharz, R.,
u. Lepkovsky, S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100,
586 (1959)
36. Jöchle, W. u. Langecker, H.: Arzneimittelforschung 12,
218 (1962)
37. Vermeulen, A. u. Demeulenaere, L.: Wirkung und Anwendung
anaboler Steroide, Kolloquium vom 4.-6. April 1963
in Berlin, Medicus Verlag Berlin 1964, S.220
38. Schor, J. u. Frieden, E.: J. biol. Chem. 233, 612 (1958)
39. Civen, M. u. Knox, W.E.: J. biol. Chem. 234, 1787 (1959)
40. Mandelstam, J.: Biochem. J. 51, 674 (1952)
41. Dubnoff, J.W. u. Dimick, M.: Biochim. Biophys. Acta 31,
541 (1959)
42. Nemeth, A.M.: J. biol. Chem. 237, 3703 (1962)
43. Kvam, D.C. u. Parks, R.E. jr.: J. biol. Chem. 235, 2893
(1960)
44. Gaetani, S. u. Spadoni, M.A.: Nature 191, 1296 (1961)
45. Lee, N.D. u. Williams, R.H.: Biochim. Biophys. Acta 9,
698 (1952)
46. Gros, P., Talwar, C.P. u. Coursaget, J.: Bull. Soc. chim.
biol. 36, 1569 (1954)
47. Feigelson, P. u. Dashman, T.: Abstr. Meeting Amer. chem.
Soc., Sept. 1959 S. 41 C
48. Greengard, O.: Fed. Proc. 19, 345 (1960)
49. Feigelson, P. u. Greengard, O.: J. biol. Chem. 237, 3714
(1962)
50. Feigelson, P., Feigelson, M. u. Fancher, C.: Biochim.
Biophys. Acta 32, 133 (1954)
51. Lee, N.D.: J. biol. Chem. 219, 211 (1956)

Herrn Professor Dr. med. H. Kewitz, Direktor
des Veterinärpharmakologischen Institutes der
Freien Universität Berlin, bin ich für die
großzügige Unterstützung, die vielseitigen An-
regungen und die wissenschaftliche Anleitung
sehr dankbar.

Lebenslauf

Am 8. September 1935 wurde ich, Ernst, Herbert Wagner, als Sohn des kaufmännischen Angestellten Walter Wagner und seiner Ehefrau Hilda, geborene Kempe, geboren.

Von 1942 bis 1950 besuchte ich die Grundschule und anschließend die Melanchthon-Oberschule in der Lutherstadt Wittenberg, wo ich 1954 die Reifeprüfung ablegte. Nach der Umsiedelung nach Westberlin und einem einjährigen Kurs am Goethe-Gymnasium in Berlin-Wilmersdorf bestand ich 1955 die Ergänzungsprüfung zum Reifezeugnis der sowjetischen Besatzungszone.

Vom Wintersemester 1955/56 an studierte ich Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin und schloß die vorklinischen Semester 1958 mit der tierärztlichen Vorprüfung ab. Nach einem weiteren Semester in Berlin hörte ich zwei Halbjahre klinische Vorlesungen an der Tierärztlichen Hochschule in Wien. Von dort kehrte ich im Wintersemester 1959/60 an die Freie Universität zurück, wo ich 1961 die tierärztliche Staatsprüfung bestand. Nach Ableistung der Pflichtpraktikantenzeit bei einem praktischen Tierarzt in Norddeutschland und in der Klinik für Tiergeburtshilfe und Fortpflanzungskrankheiten der FU-Berlin erhielt ich 1962 die Bestallung als Tierarzt.

Seit April 1962 bin ich mit der Wahrnehmung der Geschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten im Institut für Veterinärpharmakologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Kewitz beauftragt.

